



tecnolab

INNOVACIONES
PARA LA CIENCIA
Y LA SALUD

QX200™ Droplet Digital™ PCR System

Lic. María Fernanda Lazzarino



- Trayectoria de 45 años en el mercado argentino
- 70 Empleados
- Edificio de 3 plantas. 1500 m2. Distribución con vehículos propios
- Área de almacén con almacenamiento desde -80°C , -25°C , 2 a 8°C y 20°C
- Flota de vehículos y distribución propia
- Área de servicio técnico con ingenieros especializados por nuestros proveedores
- **PORTFOLIO:** Reactivos, insumos, accesorios, instrumentos y equipamiento
- **ÁREAS:** Diagnóstico, investigación, biotecnología, biología molecular, patología, inmunología, virología y química industrial.
- **EMPRESAS REPRESENTADAS:** Abbott, BioRad, Qiagen, Hain, Santa Cruz, Sera Care, Abcam, Focus, Capp, Denovix, Molecular Bio Products, Merck Millipore, MBL Bion, Fujirebio.



Workflow MLG-USDA

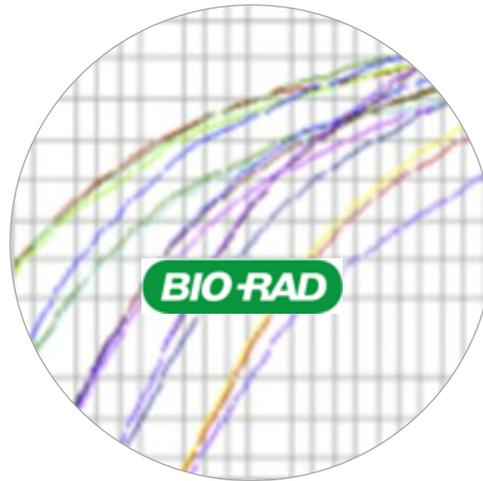


1a



PCR
Cualitativa

2a

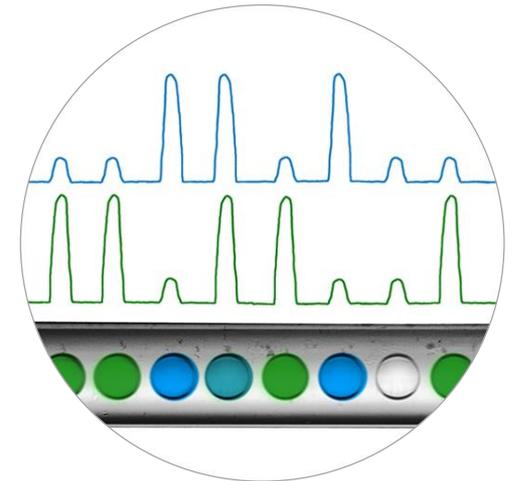


PCR en Tempo Real
Cuantificación Indirecta

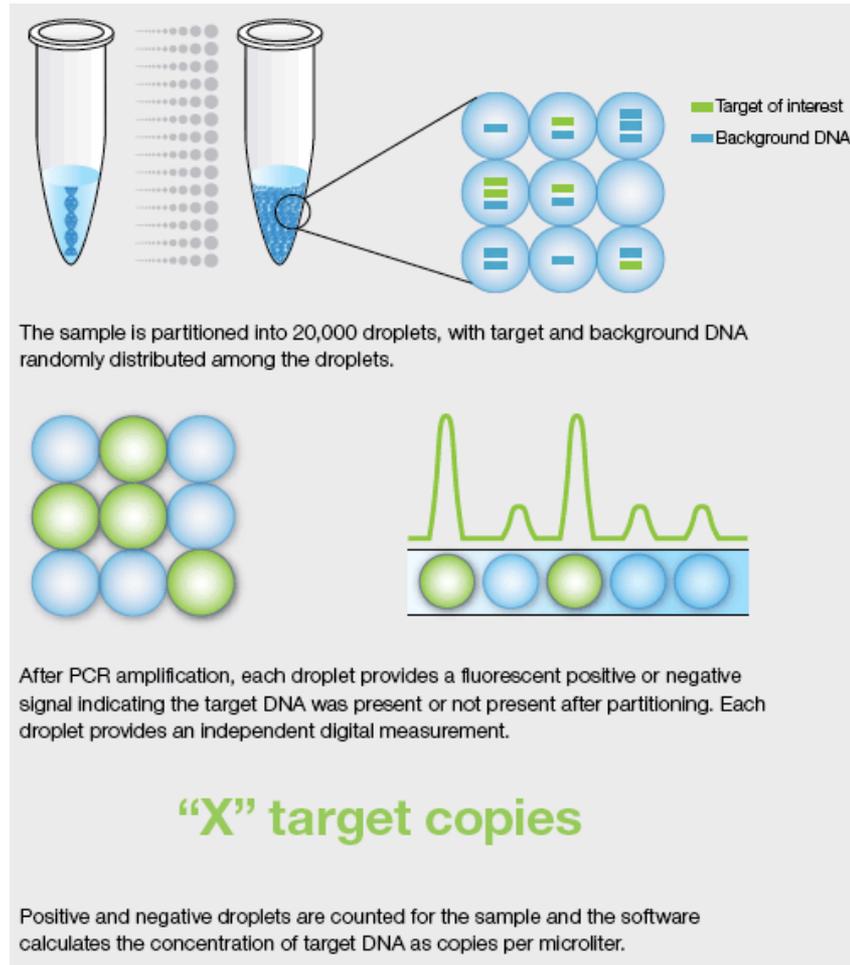


- Curva Estandar
- Dependiente de la ubicación del umbral y eficiencia de reacción

3a



PCR digital
Cuantificación Absoluta



- Un verdadero “**Contador de eventos de amplificación**”



Una sola medición



Miles de eventos de
amplificación
independientes



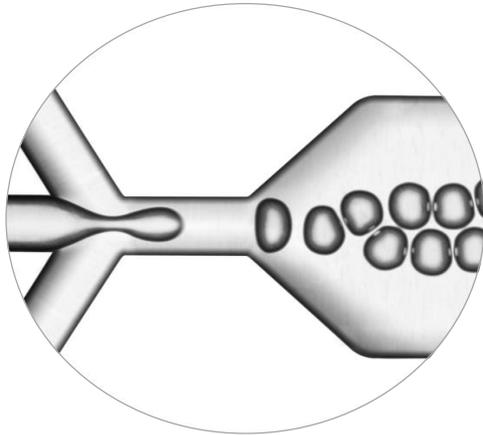
Miles de mediciones

- PCR de punto final
- Cuantificación absoluta sin la necesidad de una curva estándar

QX200™ Droplet Digital™ PCR System



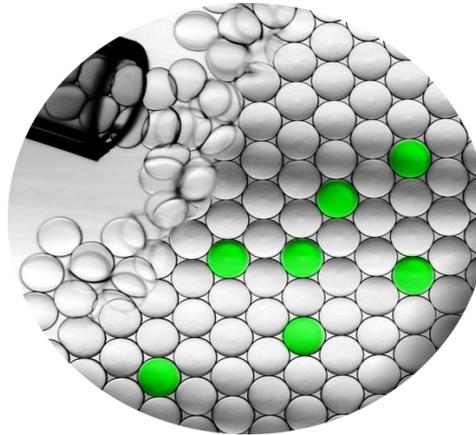
1. Generación de Gotas (20.000)



Droplet Generator



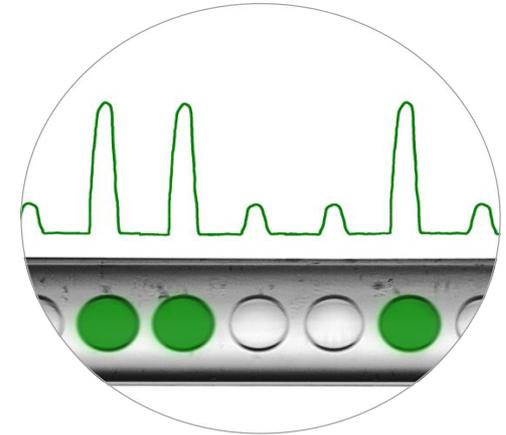
2. PCR de Gotas



Termociclador PCR



3. Lectura de gotas



Optical Reader



¿Todas las galletitas tienen igual número de chips de chocolates?

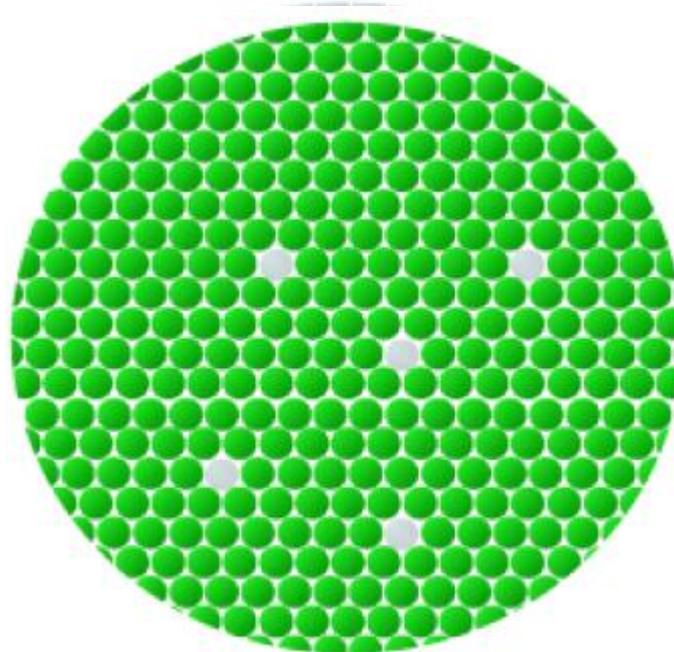


1 copia en 250 eventos, después de la PCR nosotros esperamos **1 gota positiva**

10 copias en 250 eventos, después de la PCR nosotros esperamos **10 gota positiva**

250 copias en 250 eventos, después de la PCR nosotros esperamos ...

1000 copias en 250 eventos, después de la PCR nosotros esperamos ...



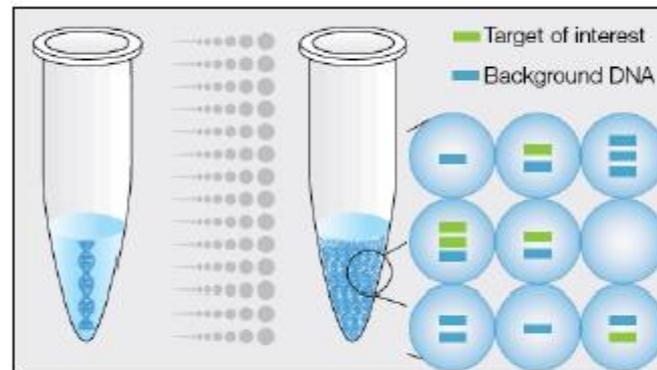
# of Target Copies	Frequency
0	handful
1	few
2	some
3	many
4	most
5	many
6	Some
7	few
8 or more	handful

- No hace falta diluir para tener una copia por gota
- La ddPCR puede manejar varias copias por gota (CDP)
- La distribución de las copias es al azar e independiente, ajustándose a la ley de Poisson

Poisson law
of small
numbers



Siméon Denis Poisson
(1781-1840)

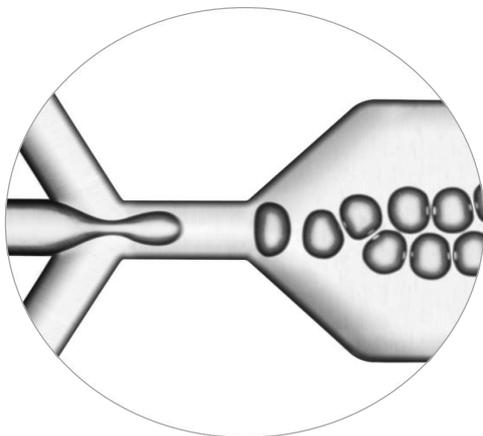


- Ensayos TaqMan / EvaGreen iguales a qPCR
- Mismo diseño de primers y sondas se trasladan a la ddPCR
- El supermix para ddPCR de Bio-Rad fue formulado específicamente para formar 20.000 gotas uniformes



Cartucho
emulsiona 8 muestras por vez

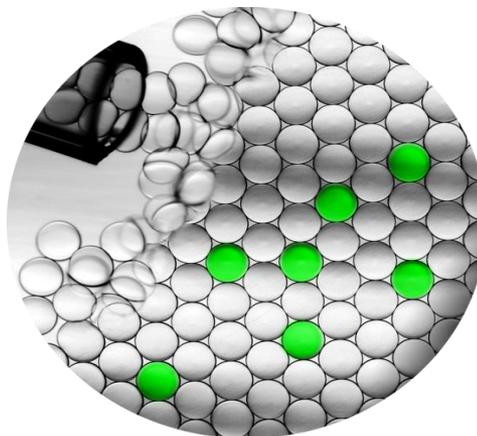
1. Generación de Gotas (20.000)



Droplet Generator



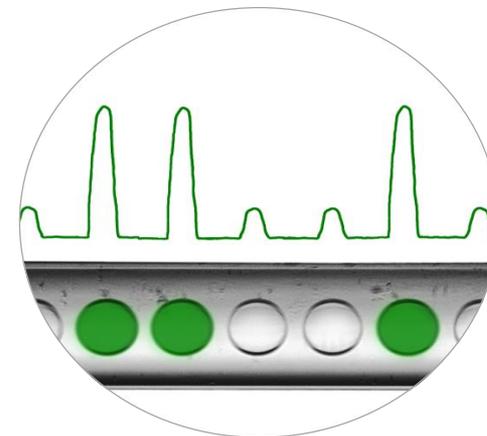
2. PCR de Gotas



Termociclador PCR



3. Lectura de gotas



Optical Reader



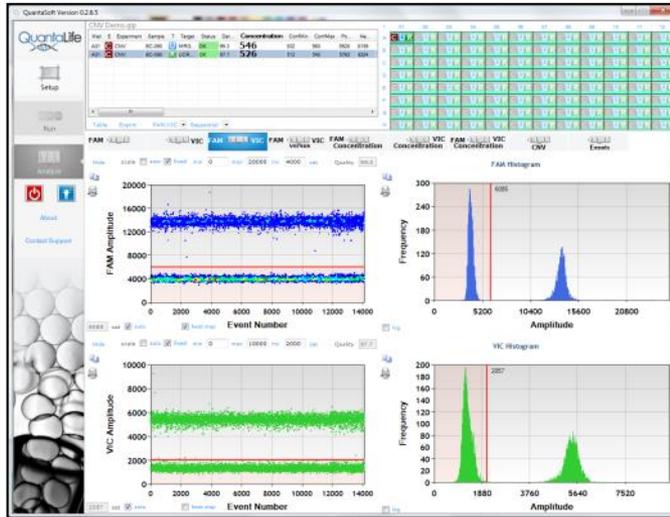


Gráfico 1-D

Las gotas positivas tienen una fluorescencia incrementada vs las negativas

Las gotas positivas tienen al menos una copia de ADN (ADNc)

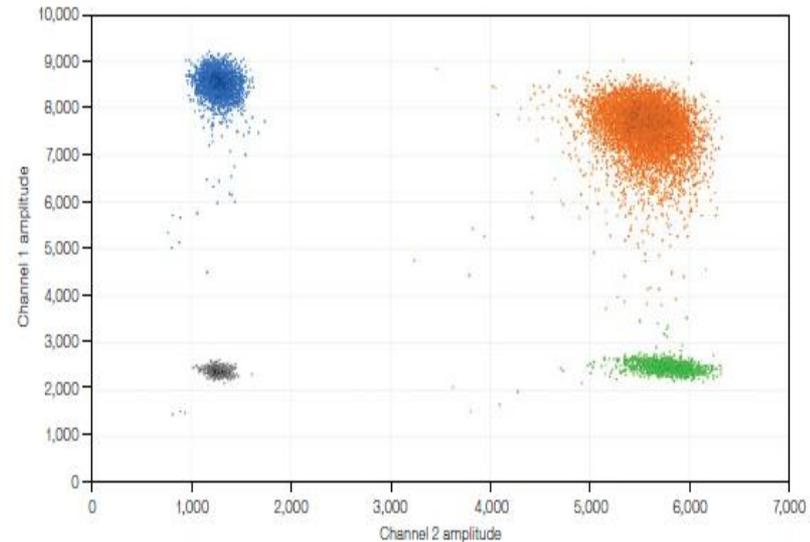


Gráfico 2-D

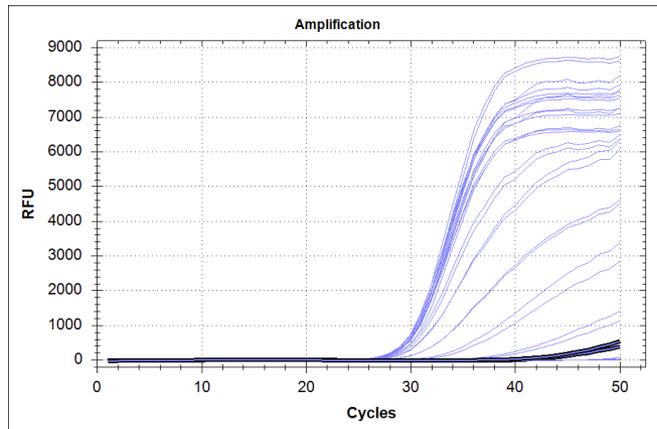
Los eventos se agrupan en clusters según contengan:

- Copias positivas para FAM;
- Copias positivas para HEX;
- Copias positivas para ambos fluorocromos;
- No contengan una lectura positiva

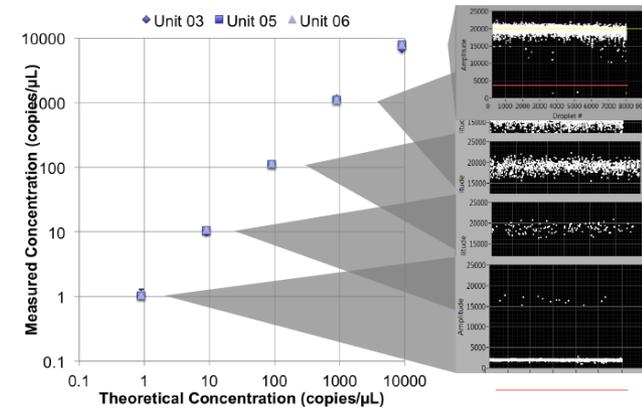
“Divide et impera”



Los inhibidores no son un problema. El fraccionamiento los excluye. La ddPCR no es dependiente de la eficiencia de reacción



qPCR



ddPCR

Resultados confiables

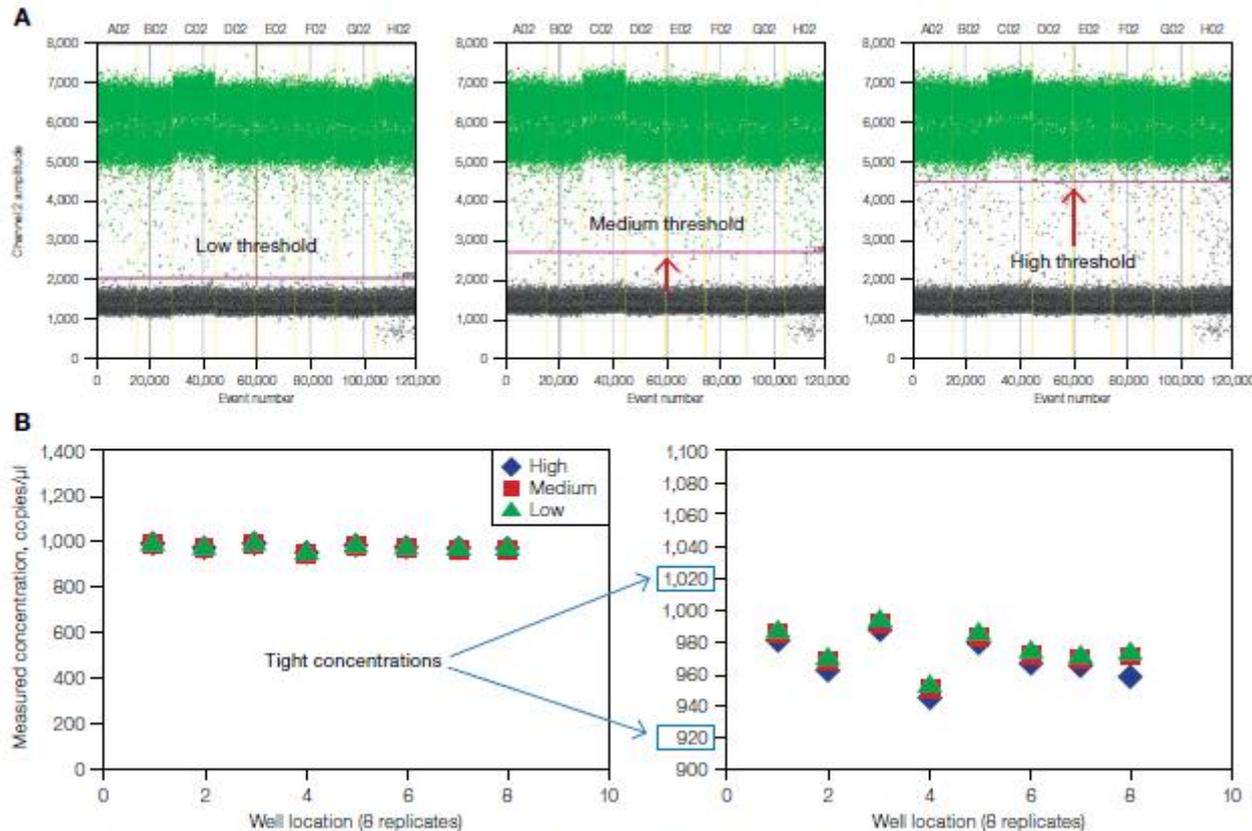


Fig. 1.13. The power of thousands of replicates using ddPCR. A, threshold options; B, measured concentration for different threshold settings.

Dos estrategias para la multiplex

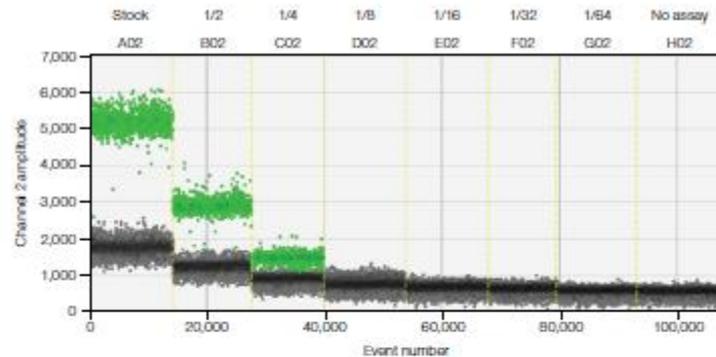


Fig. 8.5. Dilution series of an assay targeting chromosome 10 of the human genome.

Figure 8.6 represents an example of such a multiplexing strategy being used with one FAM channel assay and two HEX channel assays in a 2-D plot of the data.

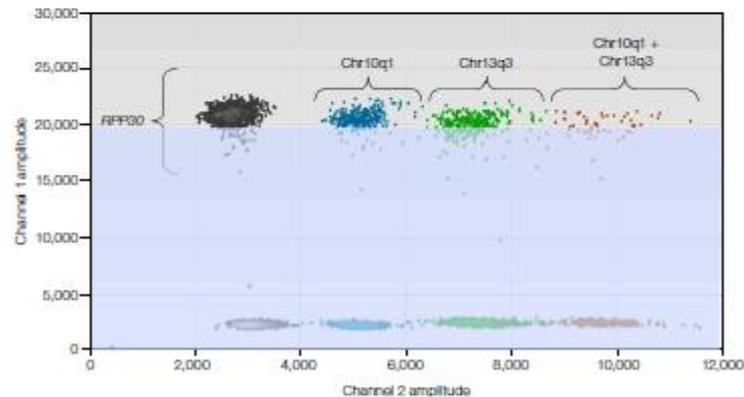


Fig. 8.6. 2-D plot of FAM amplitudes (channel 1) vs. HEX amplitudes (channel 2) for a multiplex experiment.

1. **Con sondas:** uso de distintas concentraciones de sondas para generar amplitudes de fluorescencia distintas y así poder detectar y cuantificar 2/3 secuencias diana por color. Las distintas amplitudes son generadas con distintas concentraciones de cada sonda

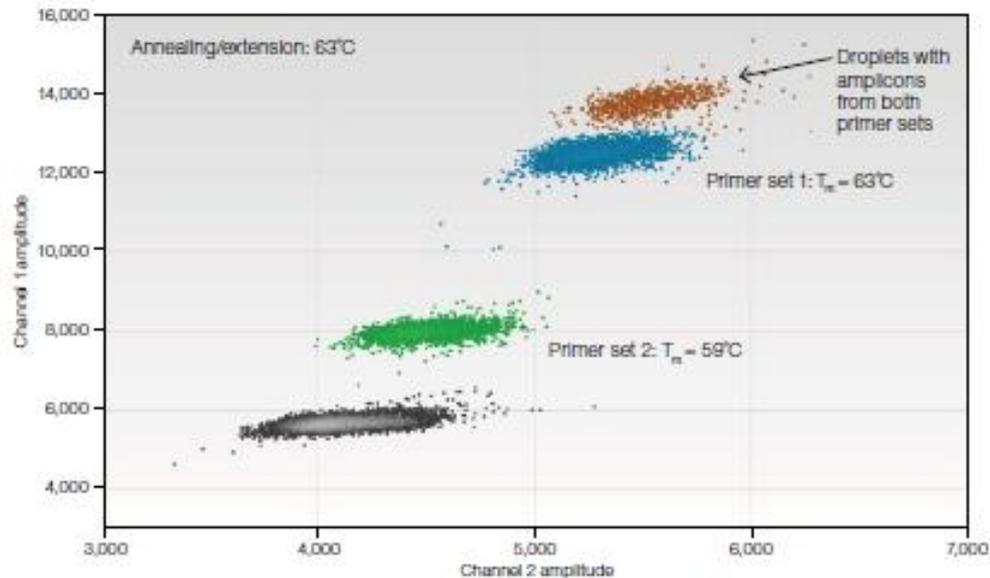


Fig. 2.15. Multiplex assays performed using ddPCR with EvaGreen. Differences in amplitude are due to differences in optimal annealing temperature. T_m , melting temperature.

2. Con EvaGreen: las distintas eficiencias de reacción de las distintas secuencias diana generan clusters que pueden ser analizados independientemente

Ventajas de la técnica por ddPCR:

- No necesita de curva patrón = cuantificación absoluta
- Produce datos con mayor precisión y confianza
- Datos mas precisos en baja concentración
- Alta reproducibilidad inter-ensayo
- Disminución de costos y tiempo



La ddPCR y su aplicación en alimentos

Algunas consideraciones:

- La demanda de pruebas de detección OGM acompaña al crecimiento de la lista de alimentos aprobados por la unión europea.
- La tendencia es hacer estudios en multiplex para lograr una disminución de tiempos y costos
- Los materiales de referencia actuales generan incertidumbre (g/Kg) y están a disposición en % de abundancia de eventos transgénicos acotados

Droplet Digital PCR for routine analysis of genetically modified foods (GMO) – a comparison with real-time quantitative PCR

*Azuka Iwobi, Lars Gerdes, Ulrich Busch, Sven Pecoraro

Bavarian Health and Food Safety Authority (LGL), Veterinärstrasse 2, 85764
Oberschleissheim, Germany

Demuestran la aplicabilidad del ensayo de ddPCR para los análisis de rutina en OGM alimentos y semillas

Mejor performance frente a los inhibidores.

Generación de estándares desde 0,1%, 0,5%, 1% y 10% de abundancia del evento en material no transgénico.

Multiplex Quantification of 12 European Union Authorized Genetically Modified Maize Lines with Droplet Digital Polymerase Chain Reaction

David Dobnik,^{*,†,||} Bjørn Spilsberg,^{‡,||} Alexandra Bogožalec Košir,^{†,§} Arne Holst-Jensen,[‡] and Jana Žel[†]

[†]Department of Biotechnology and Systems Biology, National Institute of Biology, Večna pot 111, 1000 Ljubljana, Slovenia

[‡]Section of Virology, Norwegian Veterinary Institute, P.O. Box 750, Sentrum, 0106 Oslo, Norway

[§]Josef Stefan International Postgraduate School, Jamova 39, 1000 Ljubljana, Slovenia

LOD establecido para gen endógeno en 4-plex y 10-plex fue de **10 y 24 copias** respectivamente

LOD para para los transgenes en 4-plex y 10-plex fue de **7 y 17 copias**

Sensibilidad del método requerida por la **UE < a 25 copias**

Table 4. Practicability and Cost-Effectiveness of the Developed Multiplex Assays in Comparison to Existing qPCR Approaches^a

Testing pipeline	Steps prior quantification	Number of tested samples	Estimated hands-on time (hours)	Working days until final result (days)	Relative final price per sample (%)
Direct quantification of twelve approved GM maize lines with 4-plex and 10-plex multiplex assays with ddPCR	/	1	3	0.8	100
		5	4	0.9	100
		11	5	1.0	100
Direct quantification of twelve approved GM maize lines in simplex reactions with qPCR	/	1	8	2.0	272 ^b
		5	16	4.3	292 ^b
		11	25	7.5	300 ^b

Rapid establishment of droplet digital PCR for quantitative GMO analysis

René Köppel¹ · Thomas Bucher¹

Received: 10 March 2015 / Revised: 7 May 2015 / Accepted: 9 May 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

En la actualidad, **la estabilidad y la disponibilidad de los materiales de referencia es limitada y conducen a errores de medición**, debido a cambios de la relación (peso/peso) durante el almacenamiento, y a la razón más preocupante, que proviene de procedimiento de mezclando de OGM con su material de referencia no modificado.

En el presente trabajo evaluaron y ponderaron estadísticamente las diferencias encontradas entre los % de OGM de los materiales de referencias y los cuantificados por qPCR y ddPCR.

Aquí se demostró que la PCR digital puede establecerse fácilmente como técnica gold standar para la cuantificación precisa de los eventos transgénicos presentes en una matriz compleja. Siendo posible el abandono de los materiales de referencia y en consecuencia de la incertidumbre y costos que estos acarrear.

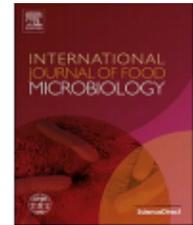
Propone seguir estudiando los eventos multi target que se encuentran distantes en el genoma para el material degradado



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

International Journal of Food Microbiology

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



Comparison between digital PCR and real-time PCR in detection of *Salmonella typhimurium* in milk



Meng Wang^{b,1}, Junjie Yang^{b,c,1}, Zhongtao Gai^d, Shengnan Huo^a, Jianhua Zhu^a, Jun Li^a, Ranran Wang^b, Sheng Xing^a, Guosheng Shi^a, Feng Shi^{a,*}, Lei Zhang^{a,b,d,*}

^a Shandong Institute for Food and Drug Control, Xinluo Street 2749, Jinan 250101, Shandong, China

^b College of Life Science, Shandong Normal University, Wenhua East Road 88, Jinan 250014, Shandong, China

^c College of Life Science, Qilu Normal University, Wenbo Road 2, Jinan 250200, Shandong, China

^d Qilu Children's Hospital of Shandong University, Jingshi Road 430, Jinan 250000, Shandong, China

De la comparación se demuestra que la ddPCR detecta *Salmonella typhimurium* en la leche con un LOD 10 veces inferior a la qPCR. e (10⁻⁴ ng/μl or 10² cfu/ml) Siendo notoriamente mas resistente a inhibición por Calcio y etanol que la qPCR Confirman la aplicabilidad de la técnica de ddPCR para el testeo en alimentos destinados a los recién nacidos, donde la tolerancia aceptada del patógeno es 0

Multiplexed Single Intact Cell Droplet Digital PCR (MuSIC ddPCR) Method for Specific Detection of Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) in Food Enrichment Cultures

Tanis C. McMahon^{1,2}, Burton W. Blais¹, Alex Wong² and Catherine D. Carrillo^{1}*

¹ Research and Development, Ottawa Laboratory (Carling), Ontario Laboratory Network, Canadian Food Inspection Agency, Ottawa, ON, Canada, ² Department of Biology, Carleton University, Ottawa, ON, Canada

Desarrollaron una adaptación de la técnica-MuSIC ddPCR (Multiplexing Single Intact Cell)-, partiendo del fraccionamiento de una suspensión de células intactas. El análisis de los resultados de fluorescencia permite detectar y cuantificar la presencia de bacterias que portan los dos genes de virulencia y de aquellas que portan una sola

ddPCR-Check STEC (próximamente)

Prueba para la detección y co-localización de los genes de virulencia (stx y eae) en una única bacteria a partir de muestras conteniendo un único positivo (genes no linkeados), reduciendo así los positivos para E. coli productora de toxina Shiga que luego no se confirman.

La detección y verificación de linkage de estos genes en un única bacteria potencia la precision del test de E. coli productora de toxina Shiga

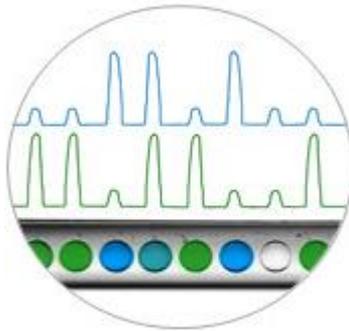


<https://www.biorad.com/ddPCR/publications>

- **Ing. Juan Pablo Rulli:** jrulli@tecnolab.com.ar
- **Lic. Maria Fernanda Lazzarino:** mflazzarino@tecnolab.com.ar

Mas información sobre la técnica:

<https://www.bio-rad.com/en-ar/category/digital-pcr?ID=M9HE2R15>



¡Muchas Gracias!