

**DETECCIÓN DE PATÓGENOS
MEDIANTE PCR CON
PREPARACIÓN
AUTOMATIZADA DE LA
MUESTRA POR
SEPARACIÓN
INMUNOMAGNÉTICA (IMS)**

mRAMA Workshop – Barcelona 21 Noviembre 2018

MERCK

Assurance GDS – Genetic Detection System

Un método molecular único para la detección de Patógenos en Alimentación



Método para la detección de Patógenos en Alimentación basado en PCR avanzada

Desarrollado para dar respuesta a las necesidades diarias y requerimientos específicos de los laboratorios de análisis de alimentos

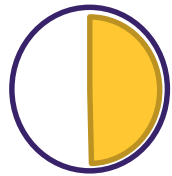
Diseñado para conseguir los resultados más precisos y rápidos -- validados en un amplio rango de matrices

Ahora disponible la Automatización de la Preparación de muestras

Assays disponibles

Resultados en el mismo día

Salmonella – ISO 16140 validation



12 hours

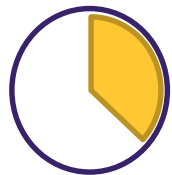
Select foods and environmental samples



20 hours

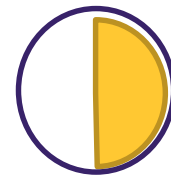
All samples

E. coli O157:H7 – ISO 16140 validation



10 hours

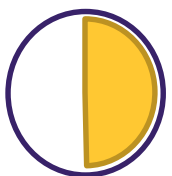
25 g samples



12 hours

375 g samples

Top STEC (ShigaToxins producing E.coli) – AOAC validation



12 hours

25g and 375 g samples

Assays disponibles

Resultados al día siguiente

Listeria spp. (ISO 16140 validation)



28 hours

Foods and
environmental
samples

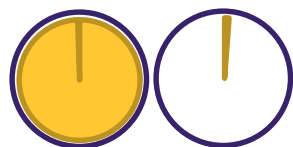
Listeria monocytogenes (ISO 16140 validation)



28 hours

Foods and
environmental
samples

Cronobacter (ISO 16140 validation on going)



26 hours

Infant formula and
ingredients

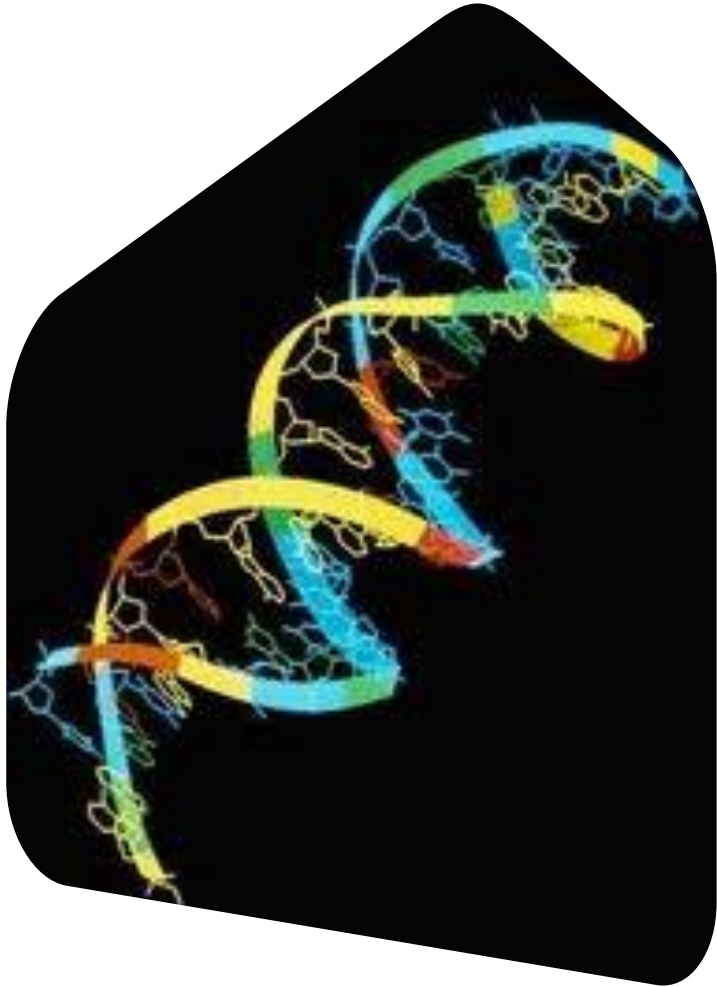


PCR

MERCK

Assurance GDS

¿Qué es el ADN?



ADN = Acido Desoxirribonucleico

Molécula dispuesta en forma de doble hélice que contiene el código genético de un organismo

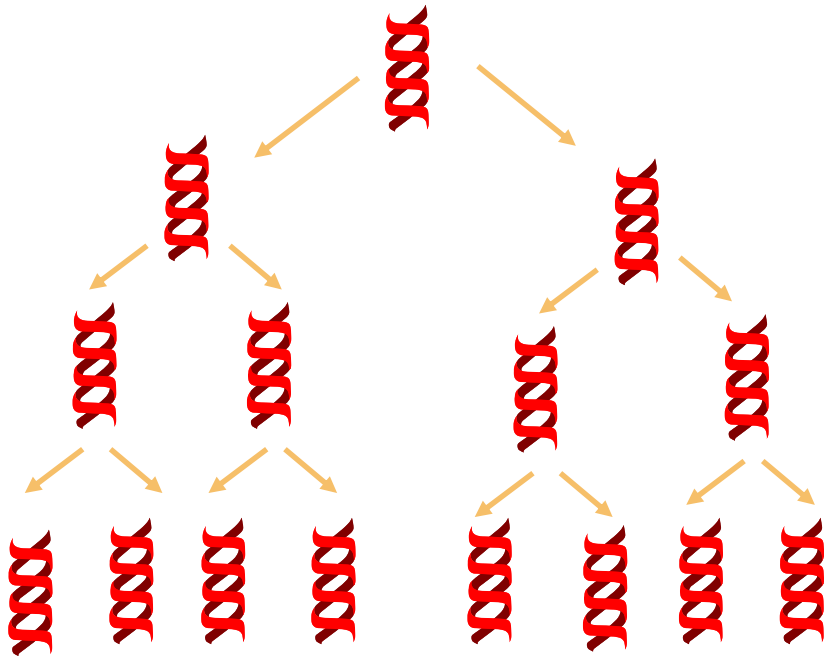
Sólo pequeñas cantidades de ADN de los organismos están disponibles

Los técnicos usan un proceso llamado PCR para incrementar el número de copias de AND para los ensayos

Assurance GDS

¿Qué es la PCR?

Amplificación de ADN



PCR = Polymerase Chain Reaction

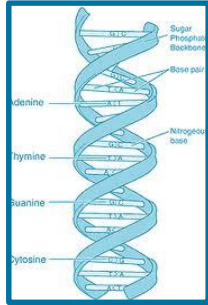
Proceso en el que se identifica y copia un fragmento específico de ADN

Exponencial – 1 copia se convierte en 2, 4, 8, 16, etc.

El ensayo de PCR se dirige a gen(es) directamente asociados a secuencias de ADN altamente conservadas para cada organismo de interés

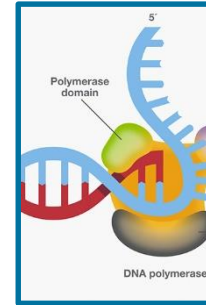
Assurance GDS

Elementos clave de la PCR



Target – Secuencia de ADN de doble cadena específica del organismo que se quiere detectar

- Secuencia de ADN que se amplifica en el proceso de PCR

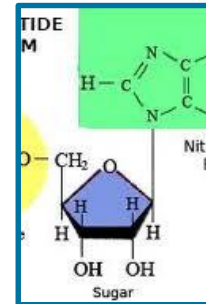


Taq polymerase – Enzima termoestable responsable de copiar el ADN

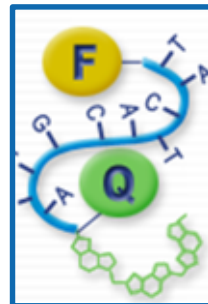


Primer – Secuencia de ADN de cadena simple complementaria de partes del ADN que se encuentra en el "Target"

- Responsable de iniciar la copia de la secuencia del ADN "target"
- Se usa en pareja (forward / reverse primers)



Nucleotidos – (A, T, C, G)
Ladrillos de ADN usados para formar las copias del ADN "target"



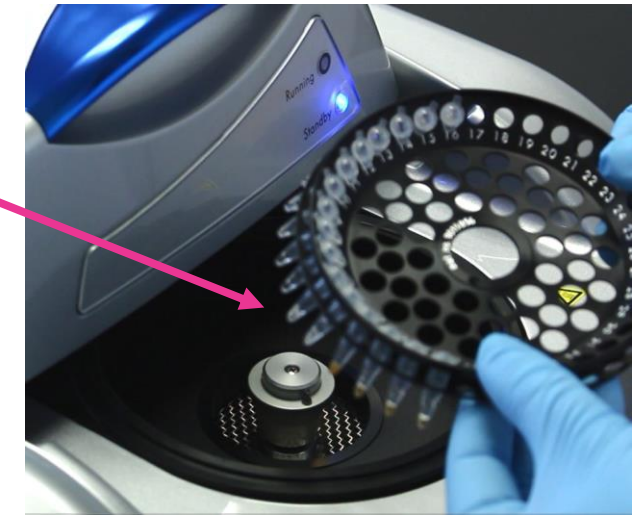
Sonda – Se une al ADN "target" asegurando que sólo se detecta el ADN "target" durante el análisis

Assurance GDS

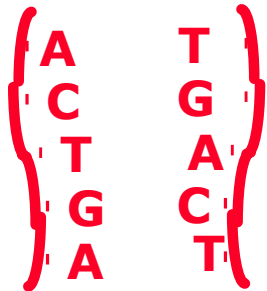
¿Qué es la PCR?

PCR es un proceso dirigido térmicamente que requiere un termociclador (1 ciclo):

Amp Tubes

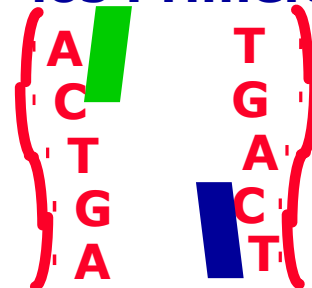


Paso 1 - desnaturalización del ADN



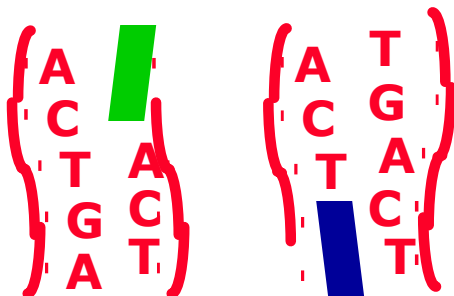
Separación de las dos cadenas cuando se calienta (95 °C)

Paso 2 - Unión de los Primers



Primers se unen a sus secuencias "target" complementarias cuando se enfría (55 °C)

Step 3 - Extension



La enzima Taq construye nuevas cadenas de ADN (72 °C)

Step 4 - Repetición del ciclo

Se repite el proceso entero repitiendo los ciclos de temperaturas



TECNOLOGIA

MERCK

Assurance GDS

Flujo de Trabajo básico

Proceso de 3 etapas



Enriquecimiento



Preparación de
Muestras Manual o
Automática



Análisis de
PCR

Etapa de Enriquecimiento

Preparación de la muestra para que la bacteria objetivo crezca a un nivel detectable

Comienza con el enriquecimiento de la muestra:



Muestra de alimento/ambiente enviada al laboratorio



La muestra se añade al caldo de enriquecimiento



Homogeinizado de la muestra



Incubar

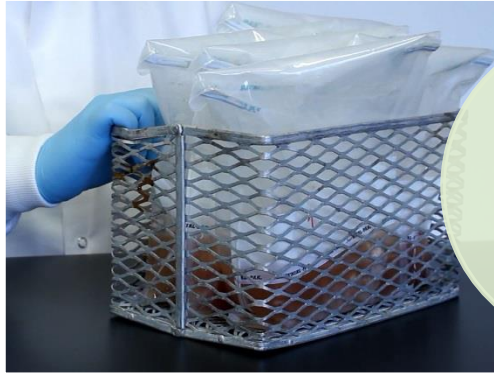
Volúmenes usuales de muestras de alimentos son 25 g y 375 g

Muestras ambientales son normalmente swabs (10 mL)

Proporciones usuales de alimento / enriquecimientos son 1:10 and 1:5

Preparación de muestras para PCR

Preparación de muestras para que el microorganismo esté listo para la PCR



Desde la
muestra
incubada

Pero cómo se
preparan las muestras
para la PCR?



A los tubos
de
amplificación

Separación Inmunomagnética (IMS)

El corazón de la tecnología GDS

Protocolo de IMS – captura y separa selectivamente los patógenos de interés

Las partículas paramagnéticas están recubiertas por anticuerpos específicos del microorganismo de interés

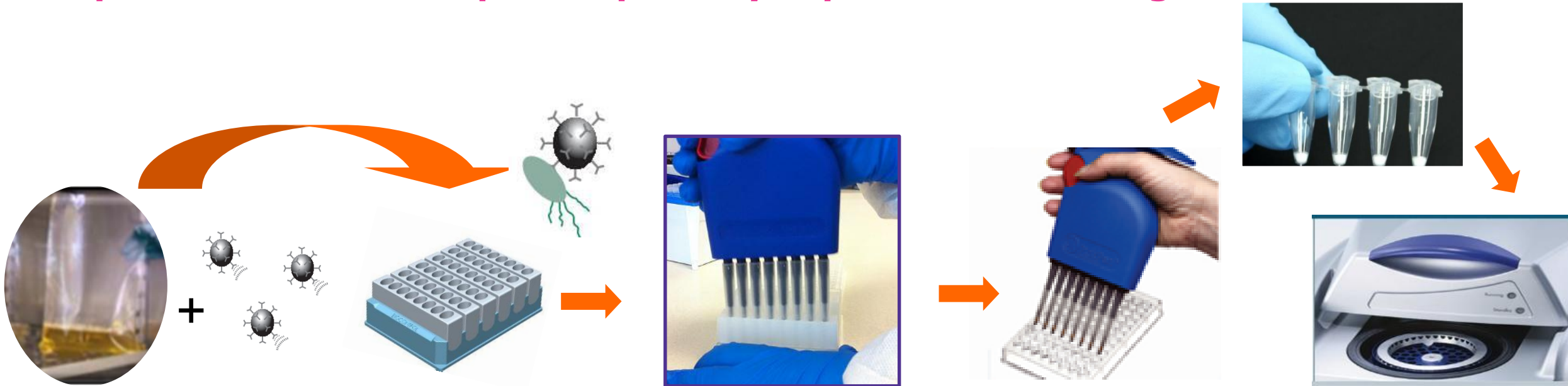
El microorganismo de interés se captura y se une a las partículas IMS mediante una reacción antígeno-anticuerpo

Imanes en un dispositivo especial llamado PickPen recoge las partículas con los microorganismos capturados



IMS

Assurance GDS emplea un protocolo de separación IM con un anticuerpo específico en solución para capturar y separar los microorganismos



1 mL de muestra enriquecida se añade a las beads magnéticas recubiertas con anticuerpos contra las bacterias de interés

Los Patógenos se capturan y se unen a las beads magnéticas mediante una reacción antígeno-anticuerpo

Los imanes del PickPen recogen las beads con los microorganismos capturados

Los Beads se resuspenden en un tampón y se transfieren a los tubos de amplificación

Los tubos de amplificación se cargan en el termociclador

PickPen IMS Preparación de Muestras

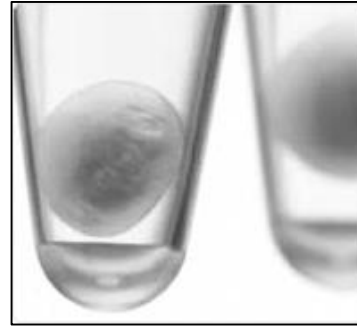


- **Mejora la precisión**– captura y concentra los patógenos (1er nivel de especificidad), disminuye el arrastre de la microflora
- **Evita la Inhibición de la PCR**– separa físicamente los patógenos de los potenciales compuestos inhibidores (matriz de la muestra, medio de enriquecimiento)

Reactivos de PCR

Assurance GDS , detección basada en sondas

- Todos los reactivos liofilizados dentro de los tubos de amplificación
- No se necesita ninguna preparación

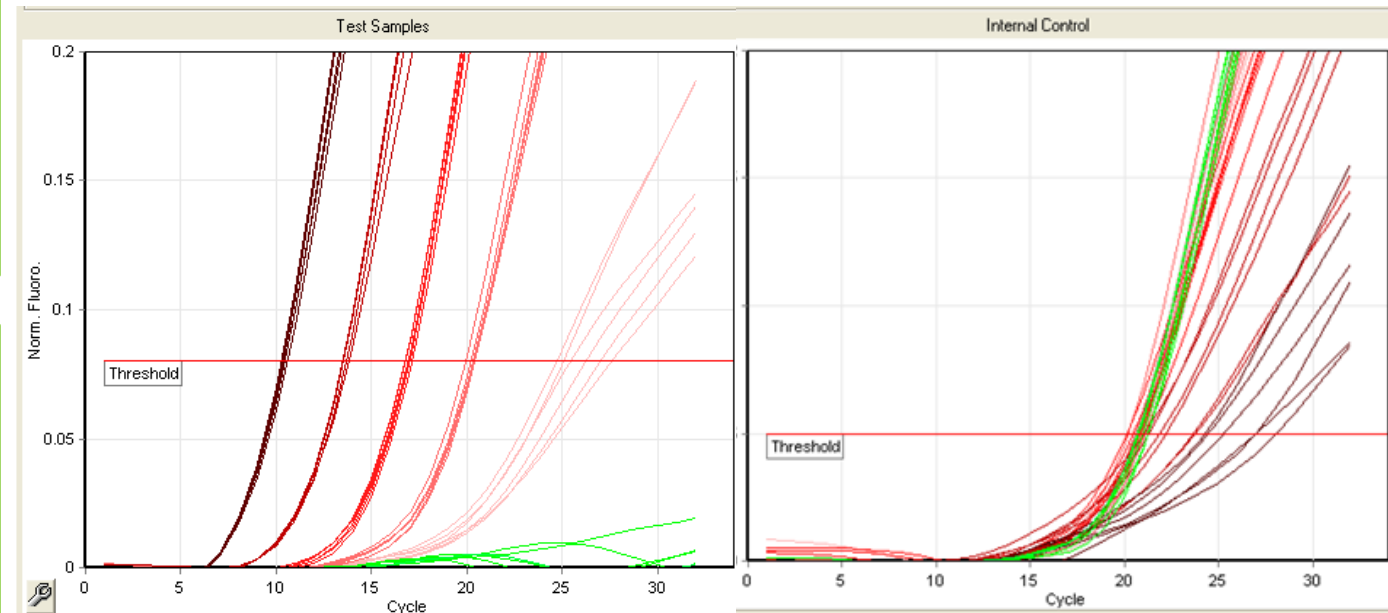


Control Interno

- Primers y sondas en cada tubo
- La señal se produce a una longitud de onda diferente que el ADN de la muestra para evitar confusiones en la identificación

Niveles de Especificidad Adicionales

- Primers específicos aseguran que únicamente se amplifica el ADN objetivo
- Las sondas MGB Eclipse aseguran que sólo se detecta el ADN objetivo



La Sonda

¿Cómo funciona la sonda MGB Eclipse?

Sonda en Solución

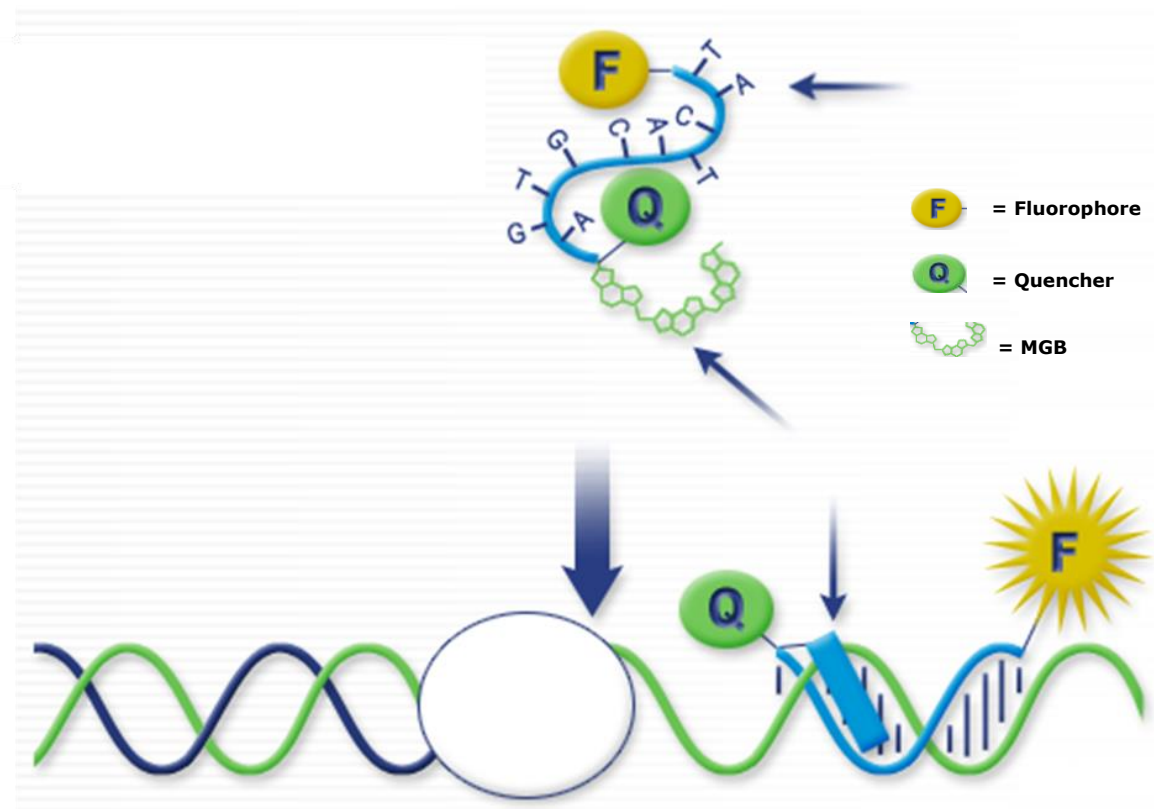
- Estructura enrollada
- Marcador Fluorescente bloqueado

La sonda se une al ADN diana específico

- La molécula Minor Groove Binder (MGB) se une a la hélice de ADN y estabiliza la unión de la sonda

Sonda unida al ADN

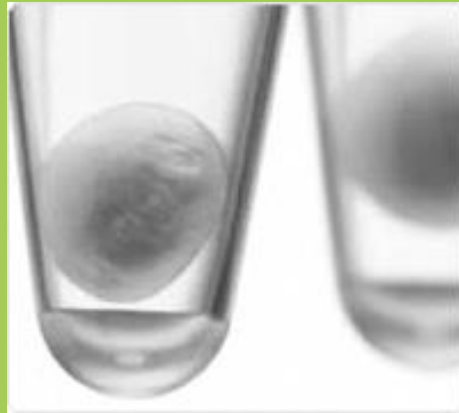
- Se transforma en lineal
- El marcador fluorescente queda expuesto y emite señal



Assurance GDS

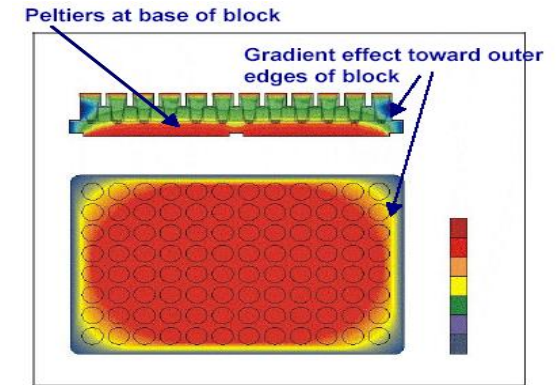
Ventajas en la Amplificación de PCR y en la Detección

Detección de PCR basado en sondas



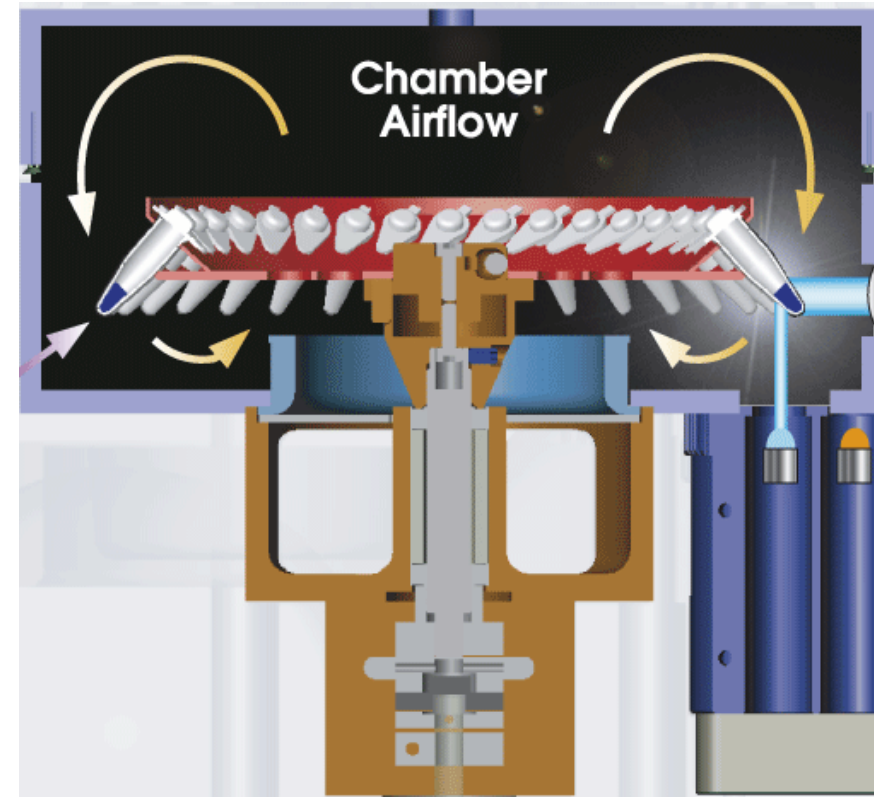
- **Mayor Especificidad** – el uso de primers y sondas añade 2 niveles adicionales de especificidad
- **Resultados fiables** – verdadero control interno en cada tubo de reacción que permite confirmar que se ha realizado la amplificación
- **Consistencia y estabilidad** – Reactivos de PCR liofilizados listos para el uso en cada tubo de reacción

Assurance GDS RotorGene Q Thermocycler



Diseño basado en rotor giratorio

- Muestras dispuestas en un formato rotatorio para el calentamiento /enfriamiento directo
- Movimiento centrífugo con un intercambio de aire constante
- Asegura una temperatura uniforme para todas las reacciones
- Elimina los largos tiempos de permanencia necesarios en los sistemas basados en bloques de intercambio de calor
- Rotores: 36 o 72 muestras





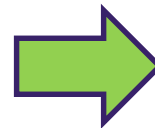
OPCIÓN DE AUTOMATIZACIÓN

Assurance GDS: AUTOMATIZACION Con PickPen PipetMax (PPMX)

Preparación de
Muestras



PickPen PipetMax PPMX



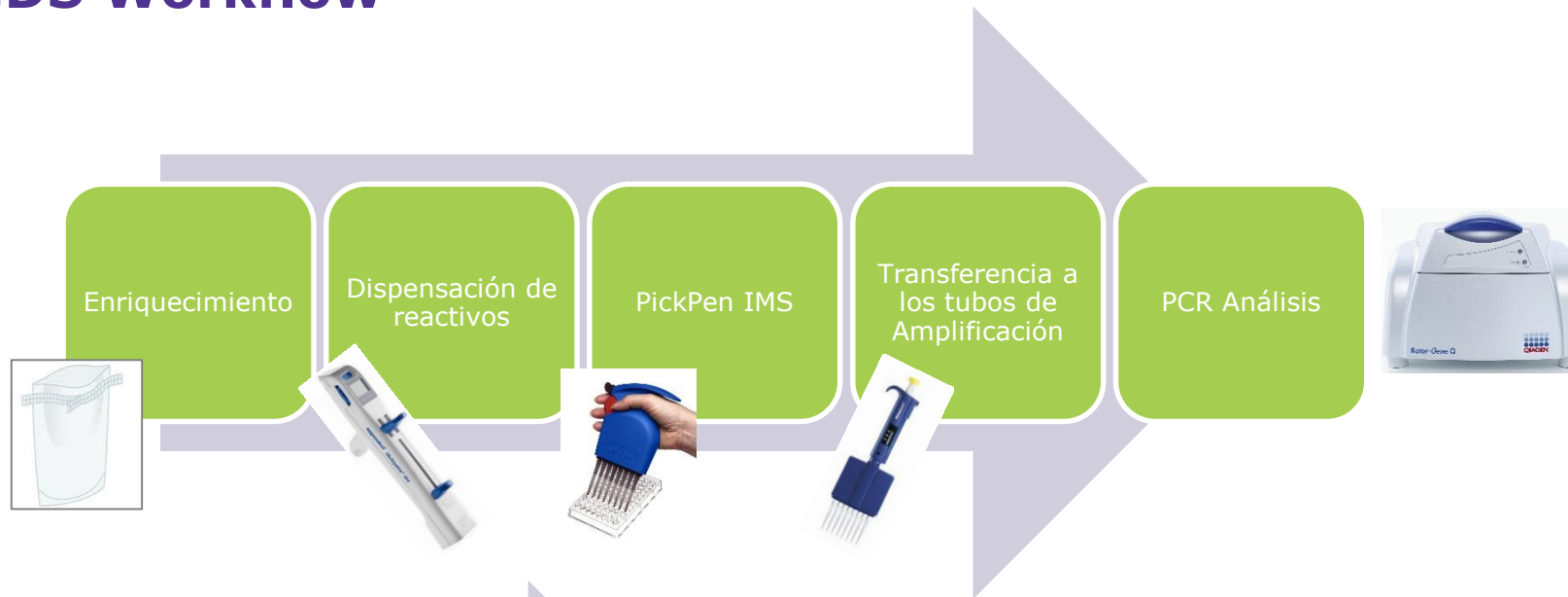
Análisis de PCR



RotorGene Q Thermocycler

Assurance GDS Workflow

Manual



Automatización



Ahorra
Tiempo de
Trabajo

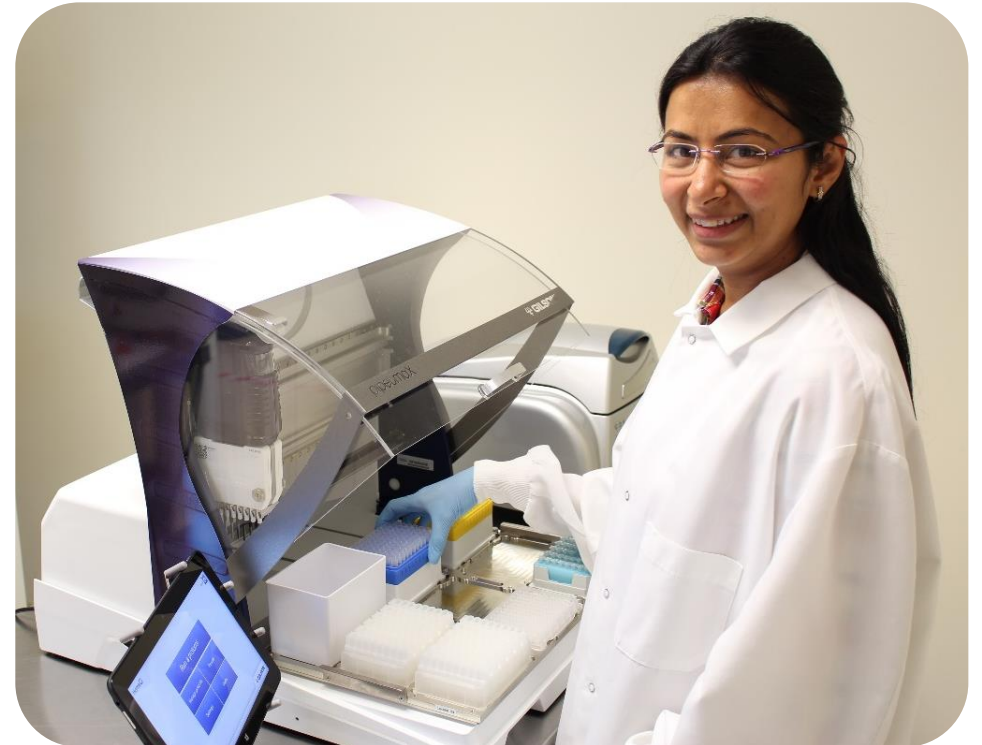
Assurance GDS

Preparación de Muestras Automatizada

¿Qué hace el PPMX?

- Dispensación de Reactivos
- Agitación con Vortex
- PickPen IMS
- Transferencia a los tubos de amplificación

GDS PickPen® PIPETMAX® (PPMX)



PPMX Características

Sencillo de instalar, preparar y descargar

- Bandeja desmontable
- Sin tubos ni cebados

Tamaño Reducido

- L 54 cm x An 67cm x Al 53 cm

Requiere Mínimo mantenimiento

Pre-programado con los protocolos de Assurance GDS

Tableta con pantalla táctil con software muy fácil de usar

- Opción de asistente paso-a-paso para guiar al usuario

Compatibilidad LIMS bi-direccional

- Compatible con lector de código de barras



Aumento de la exactitud y de la consistencia

- Elimina la variación debida al usuario
- Menor riesgo de contaminación cruzada (ruta de trabajo aséptica)
- Simplifica el entrenamiento de los usuarios

Reducción en el Tiempo de Trabajo

- Automatiza las rutinas de pipeteo y de IMS con PickPen – liberando al técnico para otras tareas
- Ahorra hasta el **50%** del tiempo de trabajo dependiendo del protocolo

Conclusiones

- Assurance GDS es un Sistema basado en PCR que proporciona resultados de Patógenos en Alimentación en el mismo día o al día siguiente
- Los distintos métodos de ensayos están validados de acuerdo con la ISO16140
- IMS permite:
 - trabajar fácilmente con matrices difíciles que normalmente pueden inhibir la reacción de PCR
 - concentrar la muestra, aumentando la sensibilidad y proveer resultados fiables
 - trabajar con PCR incluso sin extracción de AND o lisis y sin la necesidad de trabajar en una cabina o espacio de trabajo especial
- Es un método de PCR en Tiempo Real con 3 niveles de especificidad: 1º IMS, 2º Primers, 3º Sonda.
- En cada tubo de amplificación hay un Control Interno que permite confiar en un resultado negativo.
- La Preparación de Muestras se puede Automatizar para ahorrar tiempo de trabajo e incrementar la productividad del Laboratorio.

Una solución completa para el Laboratorio de análisis de alimentos: Rápido, Fiable, y Automatizable

Y ahora ...



PickPen PipetMax en acción !

