



# Avances Tecnológicos en PCR para la Detección Rápida de Patógenos en Alimentos y Medio Ambiente

M.Sc. Viviana Fino - DuPont N&H

**ACHIPIA 2015**  
**8 de octubre de 2015**  
**Santiago, Chile**



## Necesidades de la Industria Alimentaria

### Detección Precisa de Patógenos

- ✓ Tecnología molecular para una excepcional reproducibilidad, confianza y sencibilidad
- ✓ Cebadores cuidadosamente diseñados
  - Que reconozcan la secuencia específica de ADN que se encuentra solamente en el “target”
  - Minimizar los problemas de reacciones cruzadas que se encuentran comunmente en reacciones Ag-Ac
- ✓ Excelente inclusividad/exclusividad
- ✓ Validados por organismos reconocidos internacionalmente
- ✓ Resultados claros, rápidos y reproducibles



*DuPont™ BAX® es la solución!*

# Evolución del Sistema de Detección BAX®

¿Está ahí?

Detección de organismos patógenos. Rápido, seguro y fácil de usar



## The DuPont™ BAX® System X5

La plataforma Sistema BAX® X5 ofrece la misma solución rápida, precisa y fácil de usar para detección de patógenos que los clientes esperan de el método Sistema BAX®, pero en un diseño más pequeño

- The BAX® System X5 instrument has a capacity of **32-samples**.
- The BAX® System X5 PCR assays contain **64 tests**
- The computer is a thin 14-inch **laptop**
- The default equipment for the lysis procedure is the compact **DuPont™ Thermal Block**.



# Portafolio de Productos del Sistema BAX®

## PCR Standard

- ❖ *Salmonella spp.*
- ❖ *Listeria* género (std. and 24E)
- ❖ *Listeria monocytogenes* (std. and 24E)
- ❖ *E. coli* O157:H7 MP (multiplex)
- ❖ *Enterobacter sakazakii*
- ❖ Yeast and mold



## Real-Time PCR (TaqMan)

- ❖ Real-Time *Campylobacter jejuni/coli/lari*
- ❖ Real-Time *Staphylococcus aureus*
- ❖ Real-Time *Vibrio cholerae/parahaemolyticus/vulnificus*

### Cada kit contiene 96 pruebas:

- ❖ Tubos para PCR con sus tabletas
- ❖ Tapas ópticas
- ❖ Tampón de lisis
- ❖ Proteasa

## Real-Time PCR (Scorpions)

- ❖ Real-Time *E. coli* O157:H7
- ❖ Real-Time STEC suite
  - ❖ Screening assay – eae, stx
  - ❖ Panel 1 - O26, O111, O121
  - ❖ Panel 2 - O45, O103, O145
- ❖ Real-Time *Salmonella spp.*
- ❖ Real-Time *Listeria* género & *Listeria monocytogenes*
- ❖ Real –Time *Shigela*

## APROBACIONES



USDA-APHIS NPIP



Brazil MAPA



People's  
Republic of  
China AQSIQ



Health  
Canada



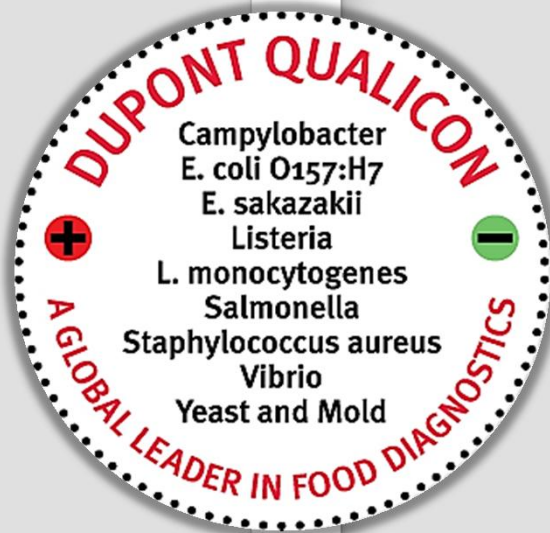
Danish  
Veterinary and  
Food Administration



Russian Rospotrebnadzor



Japanese Ministry of Health, Labour  
and Welfare



## CERTIFICACIONES

AOAC International



AOAC Research  
Institute



AFNOR



NordVal



## ADOPCIONES


USDA-FSIS




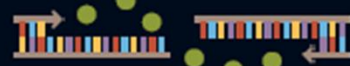
Otros países donde los gobiernos reconoce BAX®:


Mexico, Uruguay, Argentina, Costa Rica,  
Colombia, Honduras, Turquía, Australia, etc.


### BAX<sup>®</sup> System Q7 intercalating dye chemistry.

- 1 

PCR reaction tubes contain tablets that are hydrated with prepared test samples. These tablets contain intercalating dye, along with all the reagents, enzymes and primers needed for the PCR reaction. The primers match a unique genetic region of the target's DNA. Their selection determines the specificity of the assay.
- 2 


The PCR process begins with heating the sample solution to denature (separate) double-stranded DNA.
- 3 


A cooling cycle then triggers the highly specific primers to anneal (bind) to a genetic sequence on the single-stranded DNA. As the replicating enzyme begins its copying process, free-floating intercalating dye binds to the newly synthesized double-stranded DNA.
- 4 


Free-floating intercalating dye binds to this region as the DNA re-forms double strands. This chemistry uses a highly specific dye that binds to double-stranded DNA as it accumulates during PCR cycles. When exposed to light, the bound dye emits a measurable fluorescent signal.
- 5 


Successive heating and cooling cycles allow the DNA fragments to replicate (amplify) exponentially within a few hours. The PCR amplification process completes in less than three hours at the end of a cooling cycle with double-stranded DNA. The detection phase begins when samples are exposed to light. This excites the intercalating dye into producing a baseline signal. The temperature is then slowly raised to denature the DNA and measure the resulting drop in signal, which is analyzed as a melt curve.


### BAX<sup>®</sup> System Q7 probe-based chemistry.

- 1 

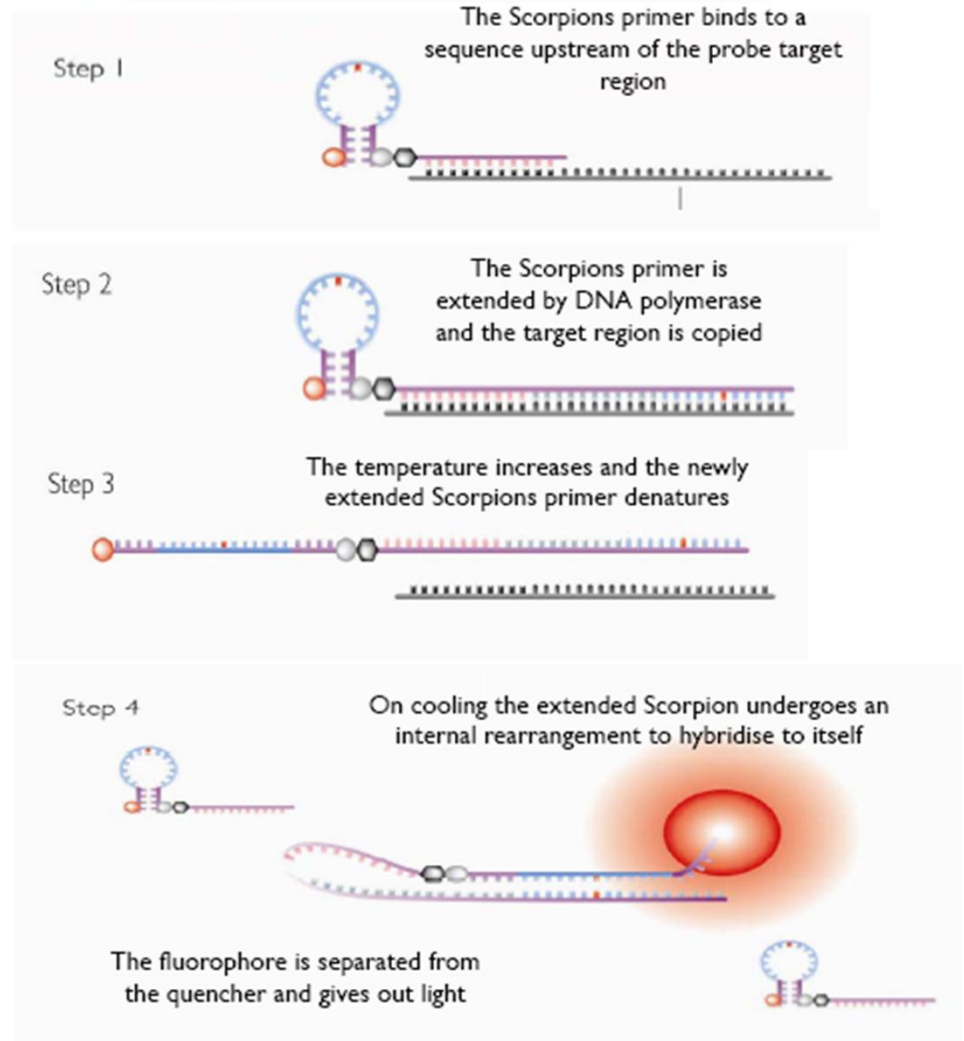
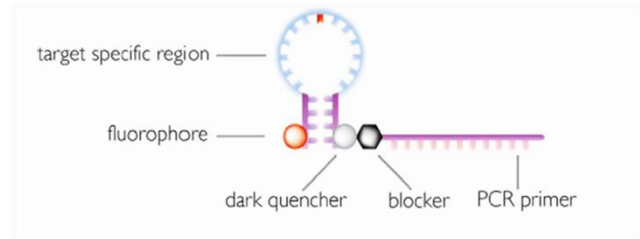
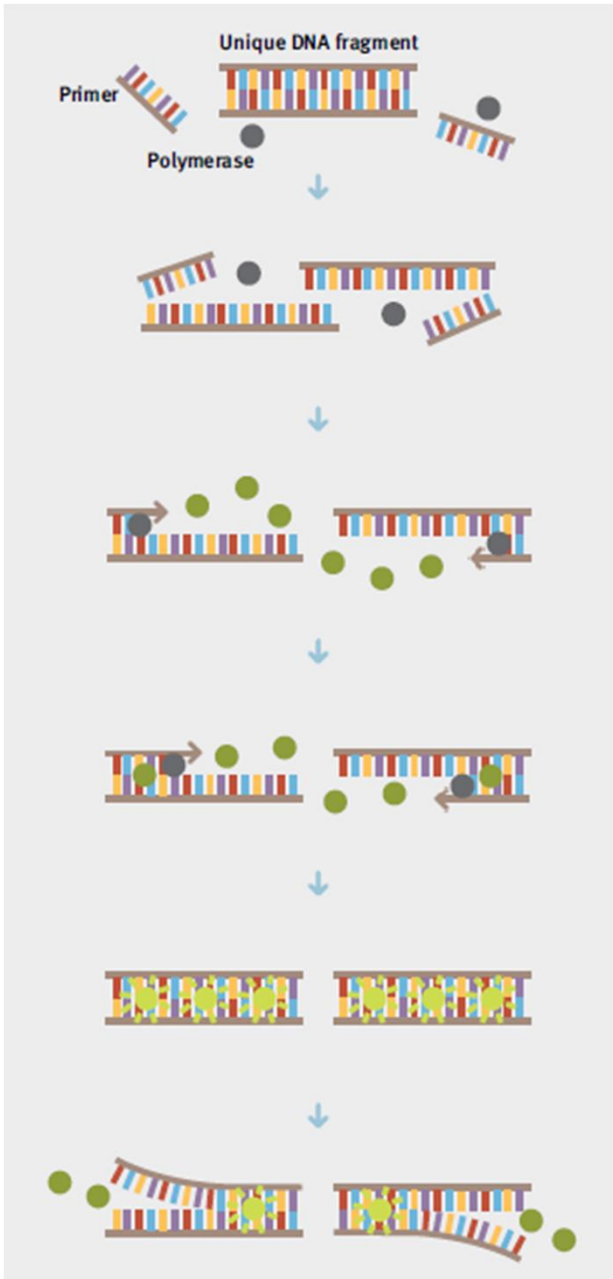
PCR reaction tubes contain tablets that are hydrated with prepared test samples. These tablets contain highly specific probes, along with all the reagents, enzymes and primers needed for the PCR reaction. The primers and probes match a unique genetic region of the target's DNA. Their selection determines the specificity of the assay.
- 2 

The PCR process begins with heating the sample solution to denature (separate) double-stranded DNA.
- 3 

A cooling cycle then triggers the highly specific primers to anneal (bind) to a genetic sequence on the single-stranded DNA. At the same time, a third primer (probe) also anneals to a region of the sequence. Probes contain a fluorescent reporter dye at one end, whose signal is absorbed by the quencher dye at the other end.
- 4 

As the DNA enzyme extends the primer, it breaks the probe apart. This separates the reporter dye from the quencher, which increases the reporter signal.
- 5 

Successive heating and cooling cycles allow the DNA fragments to replicate (amplify) exponentially. The PCR amplification process completes in about 90 minutes. A separate detection phase is not necessary because signal is measured and analyzed at the end of each cycle during amplification.





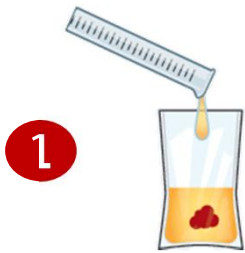
# Reactivos para PCR: Tabletas

Contienen todos los reactivos necesarios para PCR:

- ❖ Polimerasa
  - ❖ Nucleótidos
  - ❖ Cebadores
  - ❖ Reacción de Control
  - ❖ Marcador fluorescente
- 
- ❖ Empacados en tubos para PCR
  - ❖ Contienen un **control positivo de proceso** interno
  - ❖ Se eliminan las transferencias múltiples
  - ❖ Se reducen los errores por operador: **Mayor Reproducibilidad**
  - ❖ Incluyen ingredientes que previenen la inhibición del PCR
  - ❖ Los sistemas de tapas cerradas reducen la contaminación potencial por amplicones



# Protocolos de Ensayos con Sistema Dupont™ Bax®



1

## Enriquecimiento

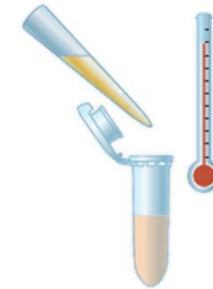
Colectar la muestra y mezclarla con el medio de enriquecimiento.



2

## Incubar

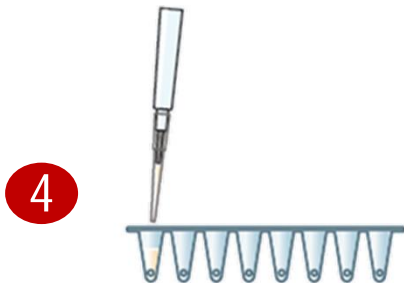
Incubar la muestra durante el tiempo designado



3

## Preparación de la muestra

Tomar una alícuota del enriquecimiento y transferirla a la mezcla de buffer lisis. Calentar los tubos para romper la pared celular y liberar el DNA dentro de la solución.



4

## Hidratación de tabletas

Transferir el lisado a la tableta contenida en cada tubo de PCR.

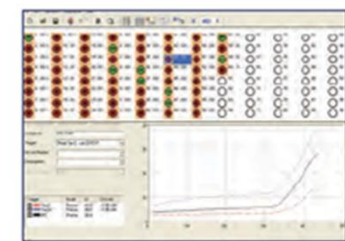


5

## Amplificación y Detección

Colocar los tubos de PCR en el equipo del sistema BAX® Q7. Después Ud. puede trabajar en otras tareas mientras **el sistema BAX®** amplifica y detecta.

6



## Revisión de Resultados

Los resultados se muestran claramente con unos íconos " Si o No" tomando un tiempo entre 1 o 3,5 hs, dependiendo del kit.

# Resultados para Ensayos Estándar



Negativo



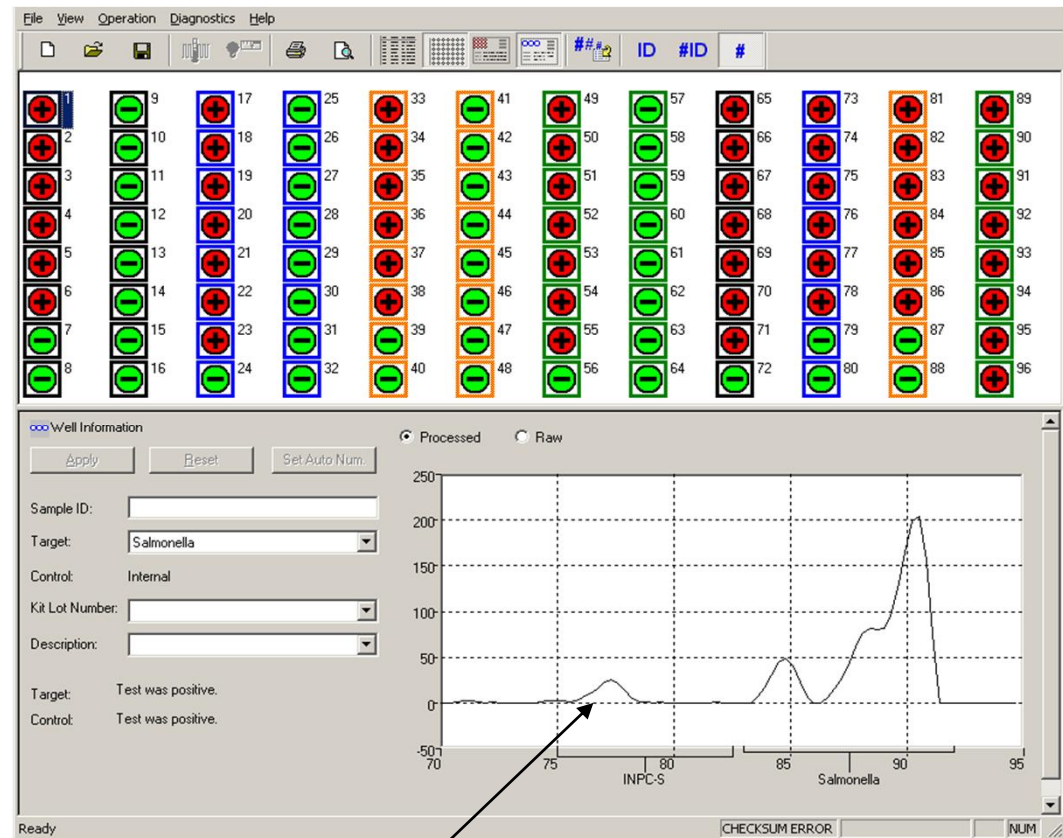
Positivo



Indeterminados



Error en la señal

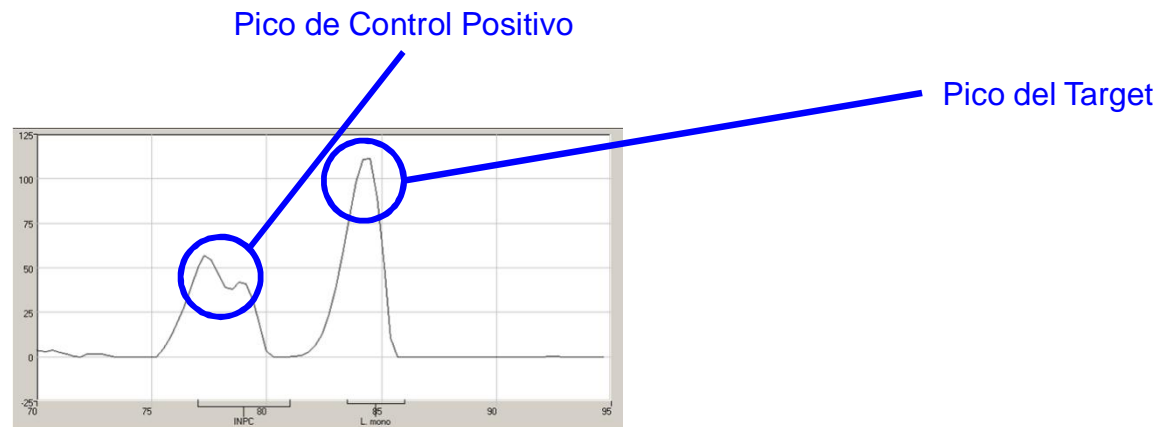


**Control Positivo Interno!!**

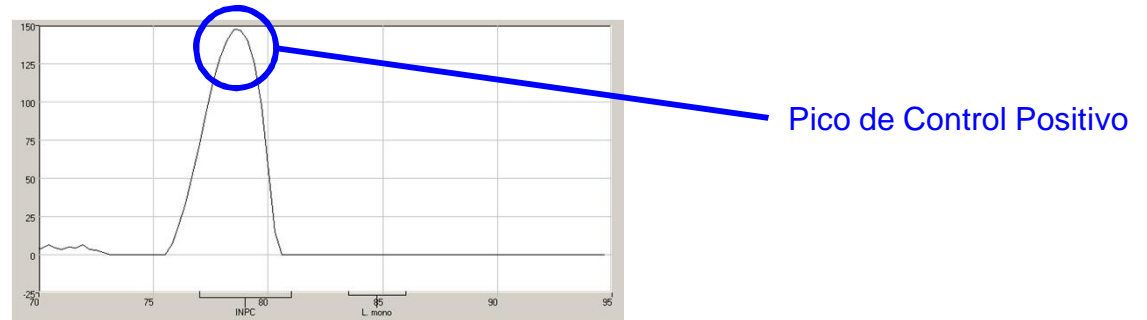
# Revisión de Resultados

Curvas: presentan picos a una temperatura determinada tanto para el control positivo interno como para el patógeno de interés

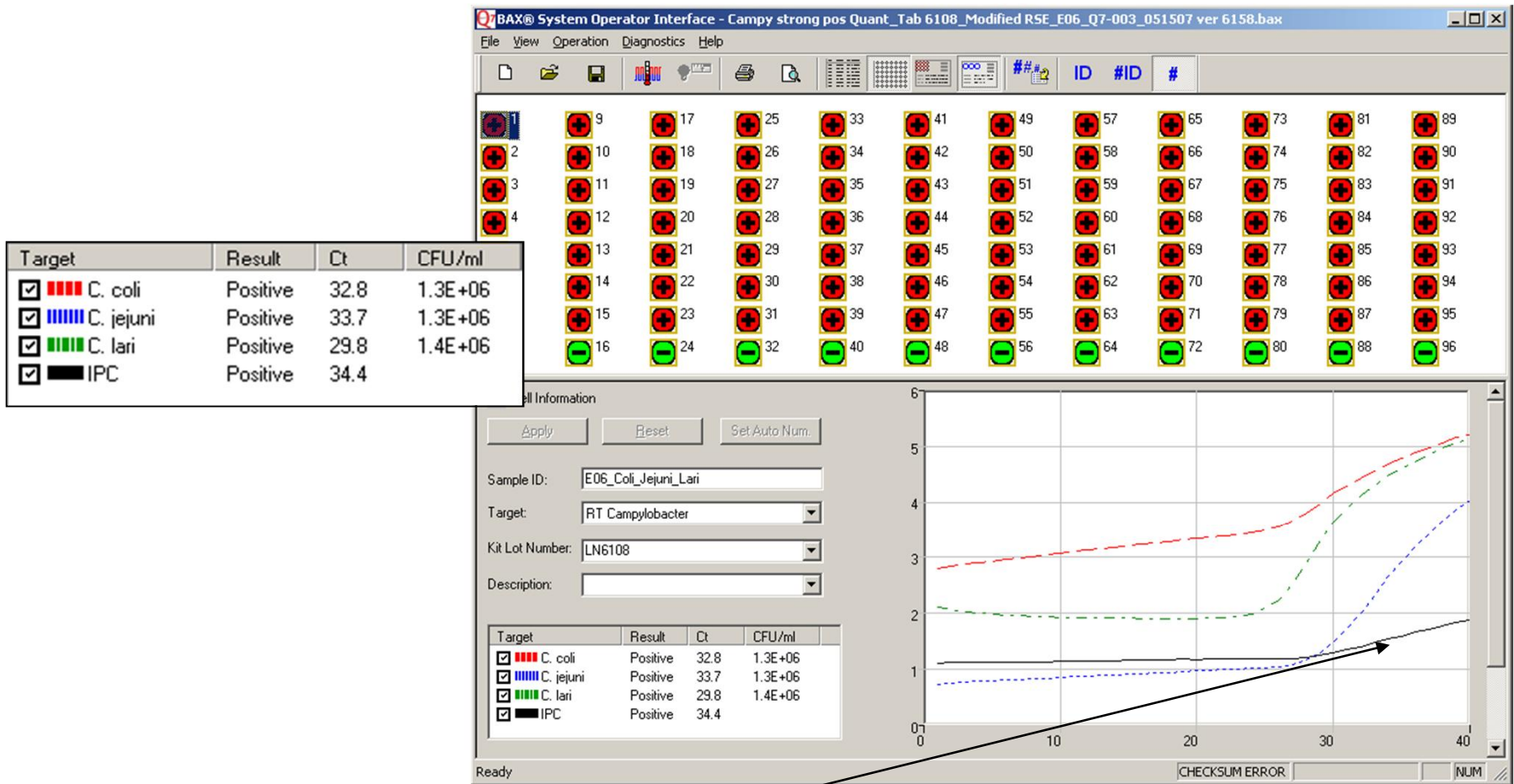
Resultado Positivo



Resultado Negativo

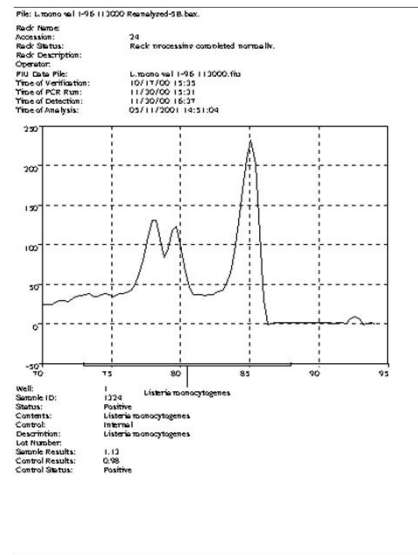


# Resultados para Ensayos en Tiempo Real



**Control Positivo Interno!!**

# Impresión de los Reportes



File: G. B. Eco1104 102100.hsc

Rack Name: ssm000001-wch  
 Assay Name: 96  
 Rack Description: Eco1104  
 Operator: Jm Smith  
 PID Data File: G. B. Eco1104 102100.hsc  
 Time of Verification: 10/19/00 13:23  
 Time of PCR Run: 11/30/00 15:21  
 Time of Detection: 11/30/00 16:21  
 Time of Analysis: 10/19/00 14:02:02

Well	Sample	Context	Ctrl	LTN	Sample	Control
1	Dist	Pos. Eco1104	Q012	112	183	Positive
2	Pos. Eco1104			112	0.84	Positive
3	Mag. Eco1104			-0.02	0.98	Positive
4	Pos. Eco1104			111	1.82	Positive
5	Pos. Eco1104			113	0.99	Positive
6	Mag. Eco1104			0.94	0.98	Positive
7	Pos. Eco1104			113	1.80	Positive
8	Pos. Eco1104			113	1.81	Positive
9	Mag. Eco1104			0.93	0.95	Positive
10	Pos. Eco1104			112	1.81	Positive
11	Mag. Eco1104			112	1.82	Positive
12	Dist	Pos. Eco1104	Q012	111	1.81	Positive
13	Pos. Eco1104			111	0.94	Positive
14	Mag. Eco1104			-0.03	0.94	Positive
15	Pos. Eco1104			112	1.82	Positive
16	Pos. Eco1104			112	1.83	Positive
17	Mag. Eco1104			-0.07	0.97	Positive
18	Pos. Eco1104			112	1.82	Positive
19	Mag. Eco1104			112	1.84	Positive
20	Mag. Eco1104			-0.02	0.94	Positive
21	Pos. Eco1104			112	0.92	Positive
22	Pos. Eco1104			113	0.93	Positive
23	Mag. Eco1104			-0.03	0.99	Positive
24	Dist	Pos. Eco1104	Q012	0.98	0.94	Positive
25	Pos. Eco1104			0.97	0.91	Positive
26	Mag. Eco1104			0.91	0.96	Positive
27	Pos. Eco1104			0.97	0.94	Positive
28	Pos. Eco1104			112	1.83	Positive
29	Mag. Eco1104			-0.03	0.99	Positive
30	Pos. Eco1104			112	1.83	Positive
31	Pos. Eco1104			0.97	0.97	Positive
32	Mag. Eco1104			0.91	0.95	Positive
33	Pos. Eco1104			112	1.80	Positive
34	Pos. Eco1104			1.87	0.93	Positive
35	Mag. Eco1104			-0.03	0.94	Positive
36	Dist	Pos. Eco1104	Q012	0.91	0.95	Positive
37	Mag. Eco1104			-0.04	0.98	Positive
38	Pos. Eco1104			0.95	1.82	Positive
39	Pos. Eco1104			0.92	1.80	Positive
40	Mag. Eco1104			-0.03	0.99	Positive
41	Mag. Eco1104			0.95	1.80	Positive
42	Mag. Eco1104			0.95	1.80	Positive
43	Mag. Eco1104			0.91	0.99	Positive
44	Mag. Eco1104			-0.07	1.81	Positive
45	Mag. Eco1104			0.92	1.81	Positive
46	Mag. Eco1104			0.90	1.80	Positive

# Paquete de Arranque de DuPont™ Sistema BAX®

Todo lo que usted necesita para comenzar

- ❖ Equipos
  - Bloques de Calentamiento
  - Bloques de Enfriamiento
  - Pipetas
  - Herramientas para tapar y destapar
  - Gradillas para tubos
- ❖ Consumibles (para 192 pruebas)
  - Puntas para pipetas
  - Tubos para lisis con sus tapas
  - Guantes de Nitrilo
- ❖ Entrenamiento en su laboratorio





*The miracles of science™*

MUCHAS GRACIAS!

Viviana Fino

DuPont Nutrición & Salud

Gerente Ventas y Técnico – Sud América

☎ +56 (9) 7615 2869 o + 56 (2) 2362 2204

✉ [viviana.r.fino@dupont.com](mailto:viviana.r.fino@dupont.com)

Visite: [www.dupont.cl](http://www.dupont.cl)