

VALIDAÇÃO DE LIMPEZA POR qPCR



Cristiane Oliveira, PhD
Especialista de Produto e Aplicação
Pensabio Biotecnologia



pensabio
A SERVIÇO DA VIDA

CCAT TGCTTCA
CTTCCATCTGCT
BIOTECON Diagnostics
CTTCCATCTGCT

Porque utilizar PCR na minha rotina?

Áreas de Aplicação

- ✓ Alterações Genéticas
- ✓ Teste de Paternidade
- ✓ Detecção de doenças
- ✓ Clonagem de genes
- ✓ Mutagênese
- ✓ Análise do DNA antigo (fóssil)
- ✓ Determinação do sexo
- ✓ Criminalística
- ✓ Análise de alimentos...

Vantagens:

- ✓ Altamente Específico
- ✓ Altamente Sensível
- ✓ Rápido
- ✓ Fácil de implementar
- ✓ Aplicável a todas as matrizes
- ✓ Reconhecido (compatível com ISO)
- ✓ Várias respostas em um teste



Princípios Básicos da PCR

O que é?

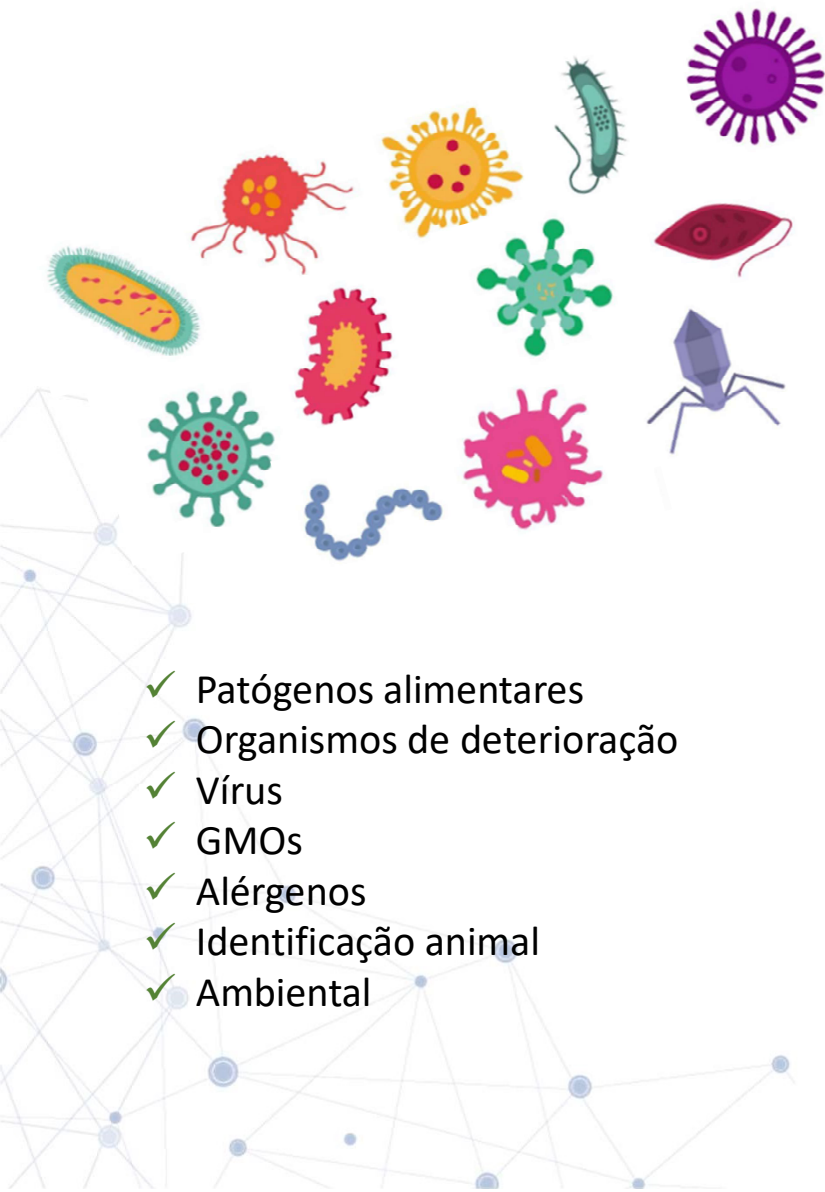
Para que serve?

Como funciona?

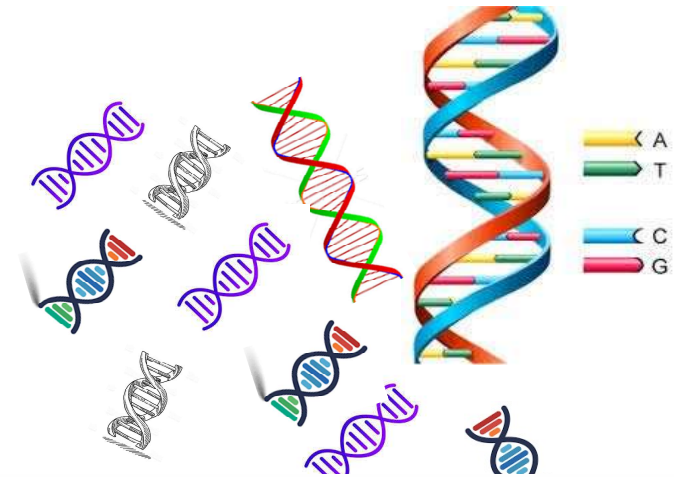
O que vou precisar?



Material Genético!!!

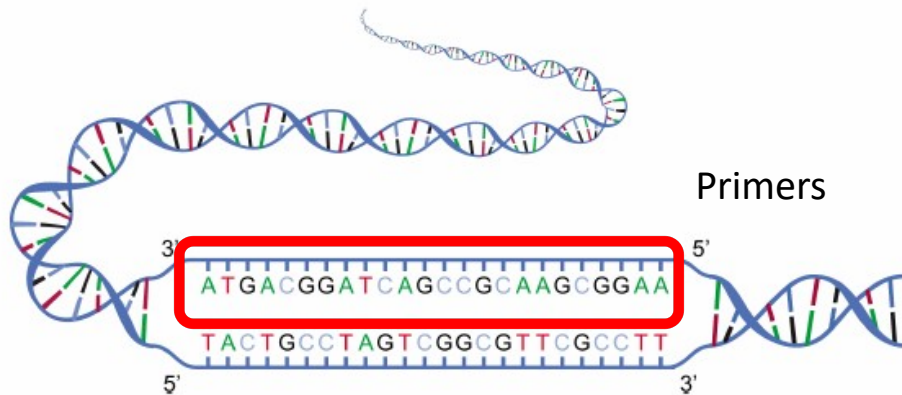


- ✓ Patógenos alimentares
- ✓ Organismos de deterioração
- ✓ Vírus
- ✓ GMOs
- ✓ Alérgenos
- ✓ Identificação animal
- ✓ Ambiental



O que é Reação em Cadeia da Polimerase?

- ✓ Amplificação/Cópias de um segmento específico do DNA dentro de um genoma (gene, parte de um gene...)

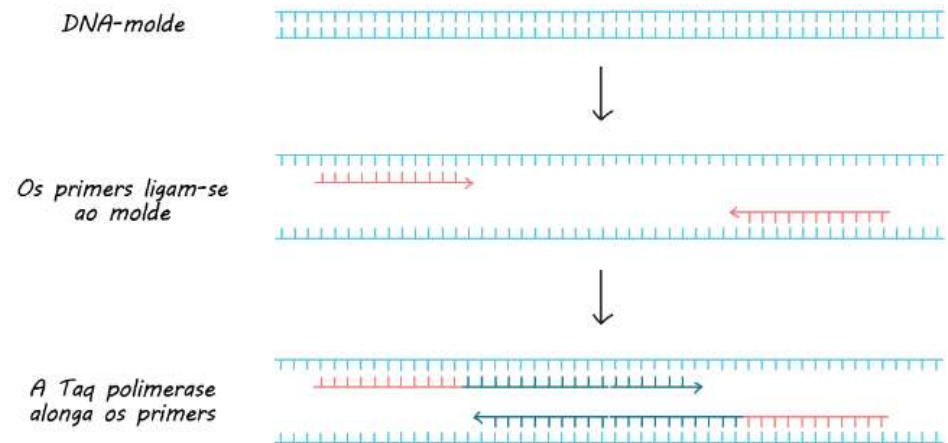


Extrair o material genético



PCR é:

- ✓ Amplificação/cópias de fragmentos de DNA



O que eu vou precisar?

1° Extrair o DNA da minha amostra

- ✓ Kits de extração 
- ✓ Equipamentos básicos de laboratório

2° Fazer reação de qPCR

- ✓ Amostra de DNA
- ✓ Master Mix de reação de PCR 
 - ✓ DNA polimerase e tampão
 - ✓ dNTPs
 - ✓ Composto fluorescente*
 - ✓ Primers*
- ✓ Equipamento de PCR em tempo real

3° Analisar os resultados

LightCycler 96 ou 480 - Roche



Kits de Extração

Rápido

Alta pureza



StarPrep Kits
Bulk



Sample Preparation Kits
Automatizado



ShortPrep Kits
Pre-pipeteado



Magnetic Preparation Kits
Colunas

Lise Rápida e Fácil

Manual e automatizado

Alta pureza de DNA / RNA

Target	Rapid		Highly purified	
	Bulk	Prefilled	Column based	Bead based/ Automated
Gram-negative bacteria	StarPrep One*	ShortPrep I	Sample Preparation I	Magnetic Preparation I, V
Gram-positive bacteria	StarPrep Two*	ShortPrep II	Sample Preparation II	Magnetic Preparation II
<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Cronobacter</i>	StarPrep One	-	-	Magnetic Preparation IV
<i>Vibrio</i> , STEC, Beer spoilage bacteria	StarPrep Three	-	-	-
<i>Dekkera</i> , <i>S. cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>	StarPrep Two	StarPrep Four	-	-
Yeast & Mold	StarPrep Two	-	-	-
GMOs, Animal ID, Allergens	-	-	Sample Preparation III	Magnetic Preparation III
Viruses	-	-	Sample Preparation IV	-



A Pensabio pode te ajudar!

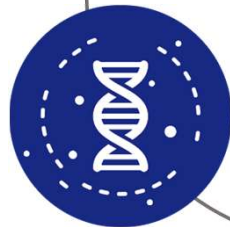
Real-time PCR Kits

- Detecção
- Identificação
- Quantificação

Kits de extração DNA e RNA

- Bulk
- Pré- pipetado
- colunas

PCR



Extração



INSTRUMENTOS

Instrumentos para processamento e análise

- Termocicladores
- Automação
- Software
- Equip. de laboratório



Biotecon Diagnostics



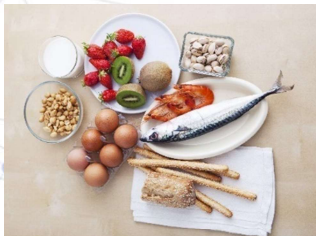
**Patógenos
Bactérias**



Fermentação



GMOs



Alérgenos



Animal ID



Higiene



Meio ambiente

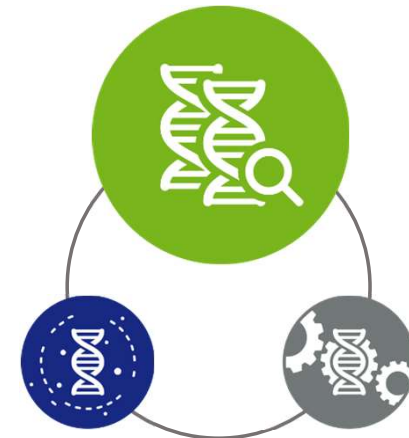


Patógenos vírus



Veterinária

PCR KITS



**Deteccão
Identificação
Quantificação**



Biotecon Diagnostics



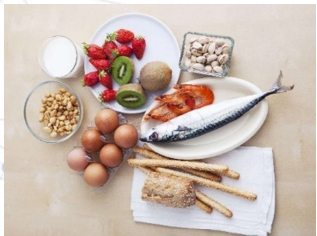
**Patógenos
Bactérias**



Fermentação



GMOs



Alérgenos



Animal ID



Higiene



Meio ambiente



Patógenos vírus



Veterinária

foodproof *Brucella* Detection Kit
foodproof *Campylobacter* Detection Kit
foodproof *Campylobacter* Quantification Kit
foodproof *Clostridium botulinum* Detection LyoKit
foodproof *E. coli* and *Shigella* Detection Kit
foodproof *E. coli* O157 Detection Kit
foodproof STEC Screening LyoKit
foodproof STEC Identification LyoKit
foodproof *Enterobacteriaceae* plus *Cronobacter* Detection Kit
foodproof *Salmonella* plus *Cronobacter* Detection LyoKit
foodproof *Cronobacter* Detection LyoKit
foodproof *Listeria* Genus Detection Kit

NEW **foodproof** *Listeria* plus *L. monocytogenes* Detection LyoKit

foodproof *Listeria* Genus Detection LyoKit
foodproof *Listeria monocytogenes* Detection Kit
foodproof *Listeria monocytogenes* Detection LyoKit
foodproof *Salmonella* Detection Kit
foodproof *Salmonella* Detection LyoKit
foodproof *Salmonella* Enteritidis & Typhimurium Detection LyoKit
foodproof *Vibrio* Detection LyoKit
foodproof *Yersinia enterocolitica* plus *Yersinia pseudotuberculosis* Detection Kit
foodproof SL *Staphylococcus aureus* Detection Kit
foodproof SL *Bacillus cereus* Detection Kit
foodproof SL *Clostridium perfringens* Detection Kit

microproof Hygiene Screening System (*Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*)

microproof *Streptococcus pneumoniae* Detection Kit

microproof *Legionella* Quantification LyoKit

foodproof *Alicyclobacillus* Detection Kit

foodproof Beer Screening Kit

foodproof Beer Screening LyoKit

NEW **foodproof** Beer Screening 2 LyoKit

foodproof Spoilage Yeast Detection 1 LyoKit

foodproof Spoilage Yeast Detection 2 LyoKit

foodproof *Dekkera* Quantification Kit

foodproof Yeast and Mold Quantification LyoKit

NEW **microproof** SARS-CoV-2 Screening/Identification Kits

NEW **virusproof** SL SARS-CoV-2 real-time PCR Kit

NEW Acu-Corona 2.0/3.0 SARS-CoV-2 real-time PCR Kits

foodproof Norovirus (GI, GII) plus Hepatitis A Virus Detection Kit

foodproof Hepatitis A Virus Detection Kit

foodproof Norovirus Detection Kit (GI, GII)

foodproof Celery Detection Kit

foodproof Gluten Detection Kit

foodproof Hazelnut Detection Kit

foodproof Peanut Detection Kit

foodproof Soya Detection Kit



Características dos Kits

Conforto

- Master mix de reação pré-pipetado, basta adicionar DNA;
- Fácil transporte (temperatura ambiente) e armazenamento (2 - 8°C)



Seguro

- Alta sensibilidade: alto volume de amostra (até 25 µl em vez de 5 µl com kits de líquidos)
- Compatível com quase todas as plataformas de qPCR;
- Poucas etapas de pipetagem: reduz o risco de contaminação cruzada;
- Padrões LyoKits foodproof® de alta qualidade:



Conceito de Qualidade

Obrigatório (acordo EN ISO 22174)

❖ Controle do Processo Interno (IPC)

- ✓ Proteção contra falso negativo;
- ✓ Inibidores de PCR;
- ✓ Qualidade do teste!!!

Controles que garantem a veracidade dos seus resultados!!!

❖ Controle Positivo

❖ Control Negativo

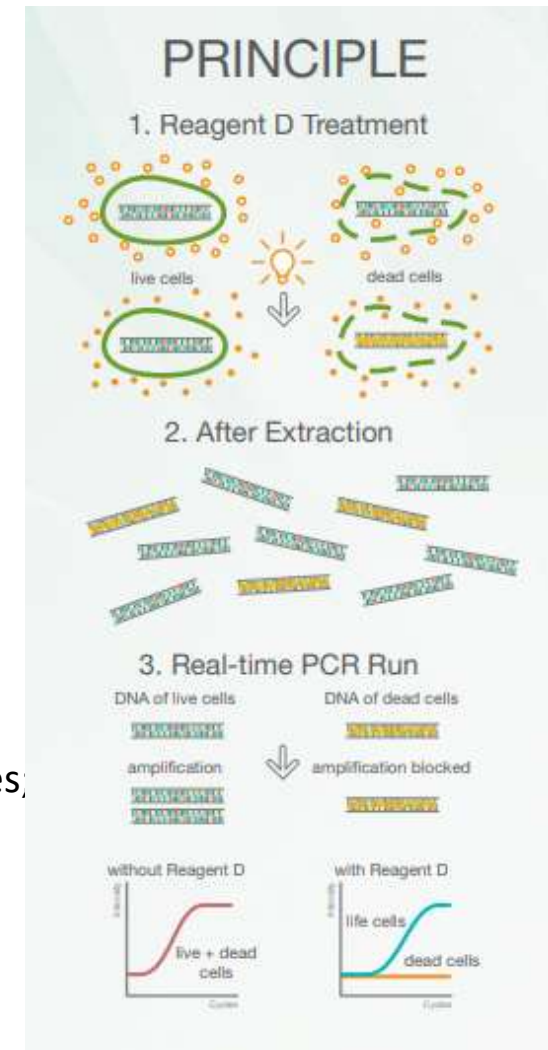
Adicional

❖ Uracil-N-Glicosilasa (UNG)

- ✓ Minimiza o risco de falsos positivos por contaminação cruzada de PCRs anteriores;

❖ Reagent D

- ✓ Proteção contra falsos positivos por células mortas com DNA livre;



Conceito de Qualidade

Obrigatório (acordo EN ISO 22174)

❖ Controle do Processo Interno (IPC)

- ✓ Proteção contra falso negativo;
- ✓ Inibidores de PCR;
- ✓ Qualidade do teste!!!

Controles que garantem a veracidade dos seus resultados!!!

❖ Controle Positivo

❖ Control Negativo

Adicional

❖ Uracil-N-Glicosilasa (UNG)

- ✓ Minimiza o risco de falsos positivos por contaminação cruzada de PCRs anteriores;

❖ Reagent D

- ✓ Proteção contra falsos positivos por células mortas com DNA livre;



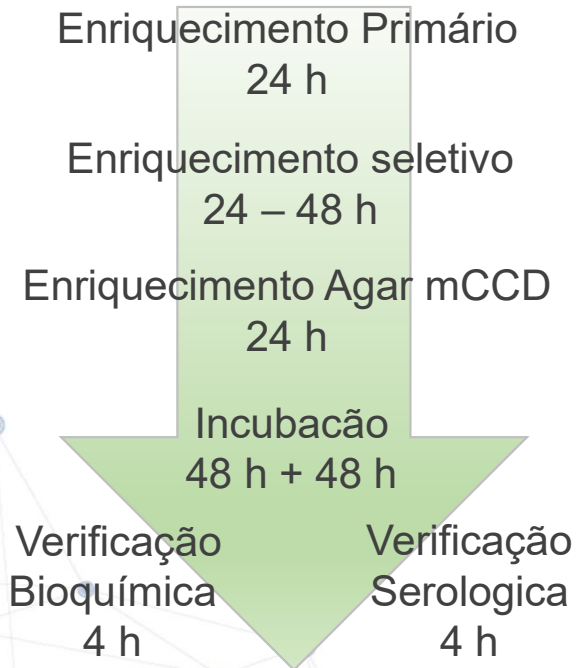
Fluxo de Trabalho

Fluxo de trabalho básico de presença / ausência de patógenos com PCR em tempo real

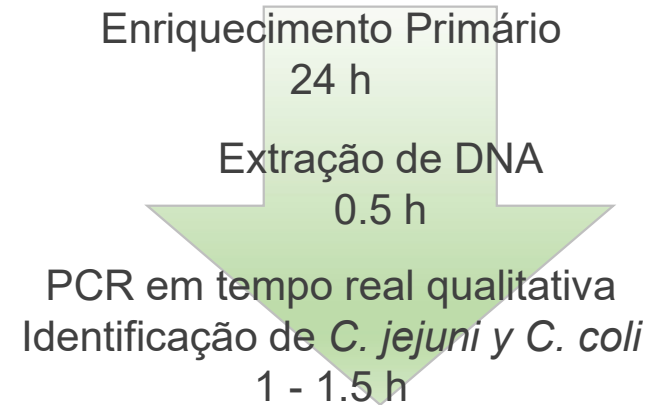


TEMPO: Microbiologia vs qPCR

Método Convencional ISO (para *Campylobacter*)



PCR em tempo real



Economia de Tempo

Resultado positivo: **> 5 dias**

Resultado negativo: **> 3 dias**



Comparando Técnicas

Características	Método tradicional	ELISA Imunologia	qPCR
Especificidade	Baixo	Médio	Elevado
Sensibilidade	Médio	Médio	Elevado
Tempo gasto resultado negativo	3 dias	24 horas	24 horas
Tempo gasto resultado positivo	3-6 dias	24-48 horas	24 horas
Influência de Matriz	Baixo	Elevado	Baixo
Influencia outros organismos	Elevado	Médio	Não
Diferenciação Vivo/Morto	Não	Não	Sim
Experiencia necessária	Elevado	Médio	Baixo
Custos	Baixo	Médio	Médio



Por que não fazer qPCR????

A decorative graphic on the left side of the slide, consisting of a network of interconnected nodes and lines, resembling a molecular structure or a complex web.

Facilidade

Especificidade

Sensibilidade

TEMPO

Experiência

Processamento

Qualidade

Exatidão



CONHEÇA O QUE PODEMOS FAZER POR VOCÊ

A Pensabio tem como objetivo servir com inovação e conduzir soluções personalizadas que atendam as suas necessidades.



Suporte técnico
e científico

16 Pessoas
dedicadas



Manutenção
e Serviço



Treinamentos
teórico e
prático



Cursos e
Capacitação



5 PhD
2 MsC



CONHEÇA O QUE PODEMOS FAZER POR VOCÊ

