

<https://medicinaprecisionandalucia.iavante.es> | #PANMEP

PANMEP

PROGRAMA ANDALUZ DE FORMACIÓN EN MEDICINA
PERSONALIZADA Y DE PRECISIÓN

EXPERTO UNIVERSITARIO EN MEDICINA PERSONALIZADA Y DE PRECISIÓN

TÉCNICAS MOLECULARES Y CELULARES EN MEDICINA DE PRECISIÓN

FORMACIÓN
IAVANTE
Fundación
Progreso y Salud

COLABORA

Johnson & Johnson

ORGANIZAN

un
i Universidad
Internacional
de Andalucía
A



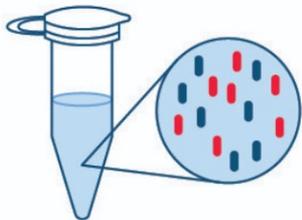
Junta de Andalucía
Consejería de Salud y Consumo

Contenido

- 1) Ventajas y usos de la dPCR
- 2) Similitudes y diferencias entre plataformas de dPCR
- 3) Análisis de resultados de dPCR
- 4) Aplicabilidad clínica y estudios observacionales de dPCR

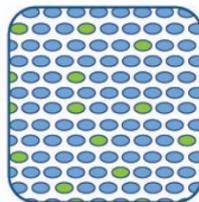
1) Ventajas y usos de la dPCR

Particularidades de la dPCR



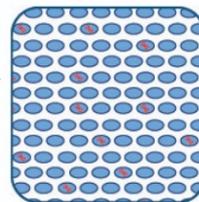
Dilución de la muestra y preparación de la mezcla de reacción de la PCR

PREANALÍTICA



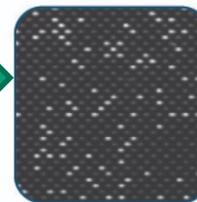
La reacción de PCR se divide en miles de reacciones individuales.

PARTICIÓN



Amplificación de divisiones en PCR convencional

AMPLIFICACIÓN



Revisión y cuantificación absoluta

ANÁLISIS

1) Ventajas y usos de la dPCR



Cuantificación absoluta

No hacen falta referencias ni curvas estándar



Alta tolerancia a inhibidores

Debido a la partición y medida a tiempo final



Mayor precisión

Detecta diferencias con cambios muy pequeños



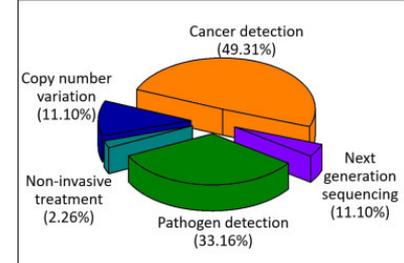
Mayor sensibilidad

Detecta mutaciones raras y dianas muy diluidas



Alta reproducibilidad

Elimina el sesgo de eficiencia de amplificación



CNVs

Cambios en el número de copias

Detección de mutaciones raras

SNVs de baja frecuencia

Cuantificación

Librerías de NGS

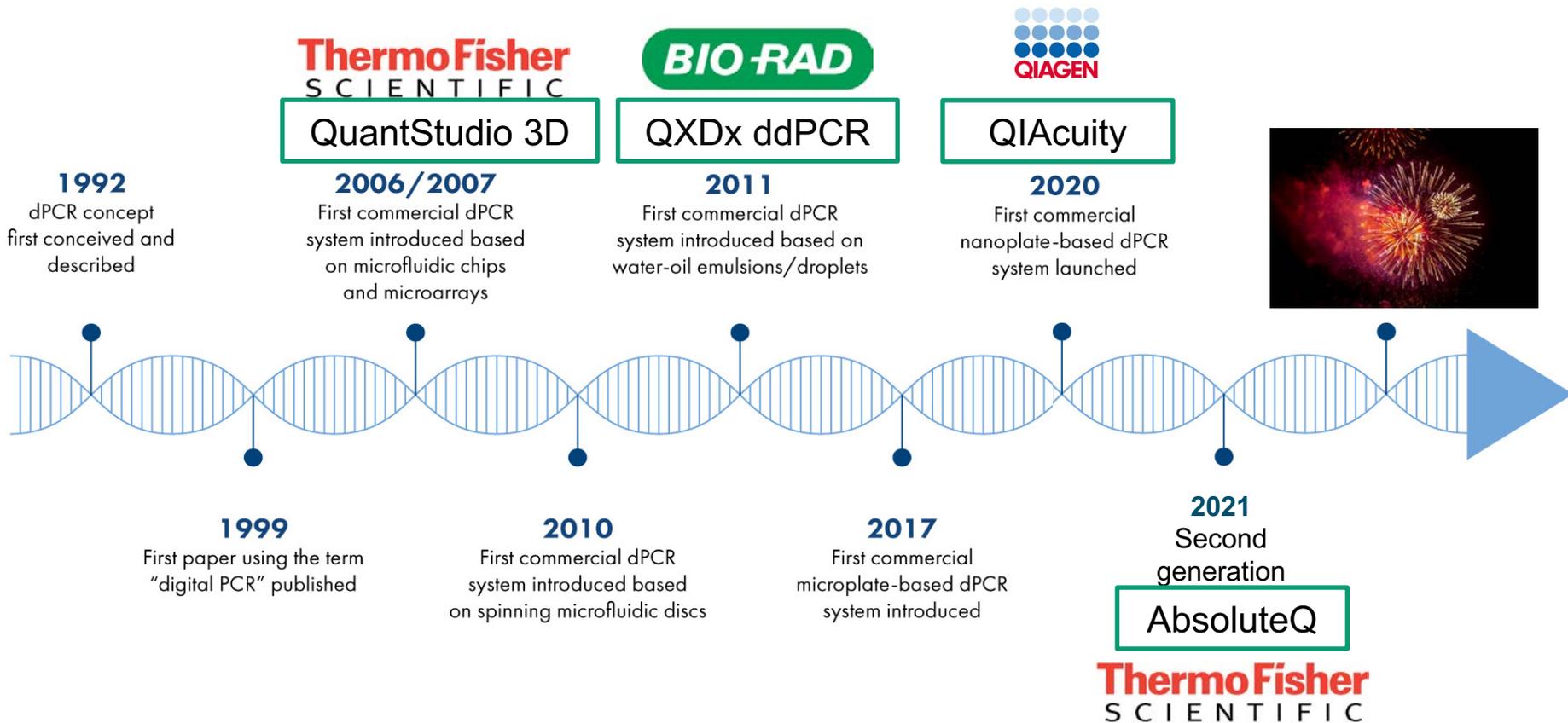
Carga viral

Detección de virus y patógenos

Expresión génica

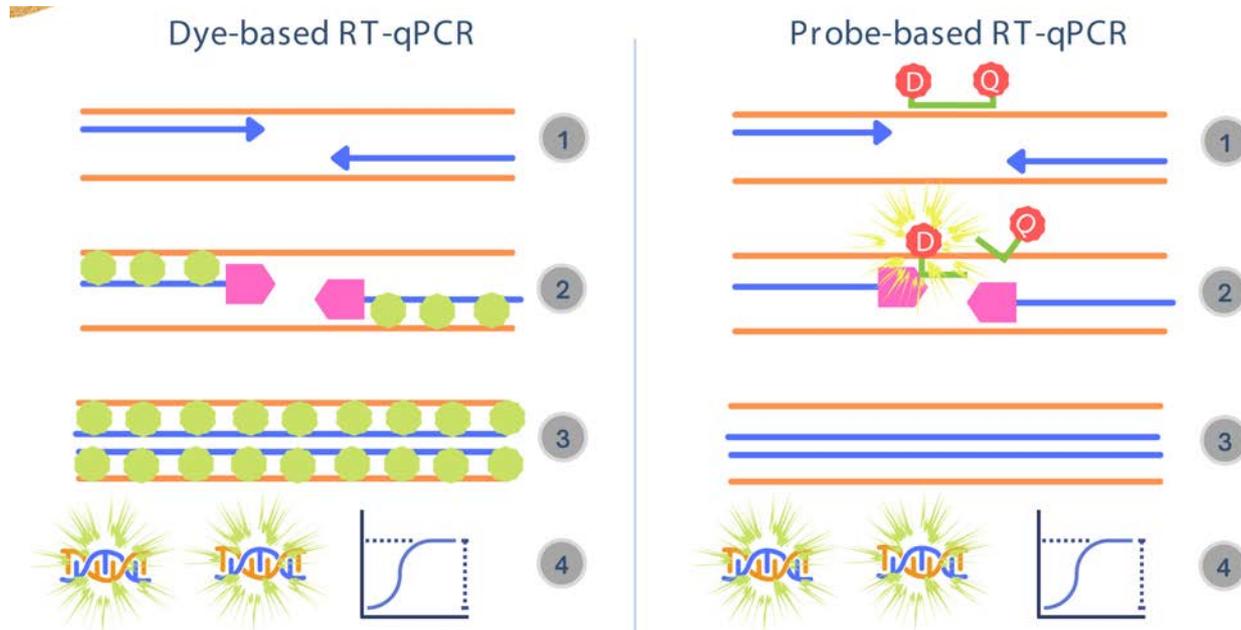
Análisis de cambios de expresión

2) Similitudes y diferencias entre plataformas de dPCR

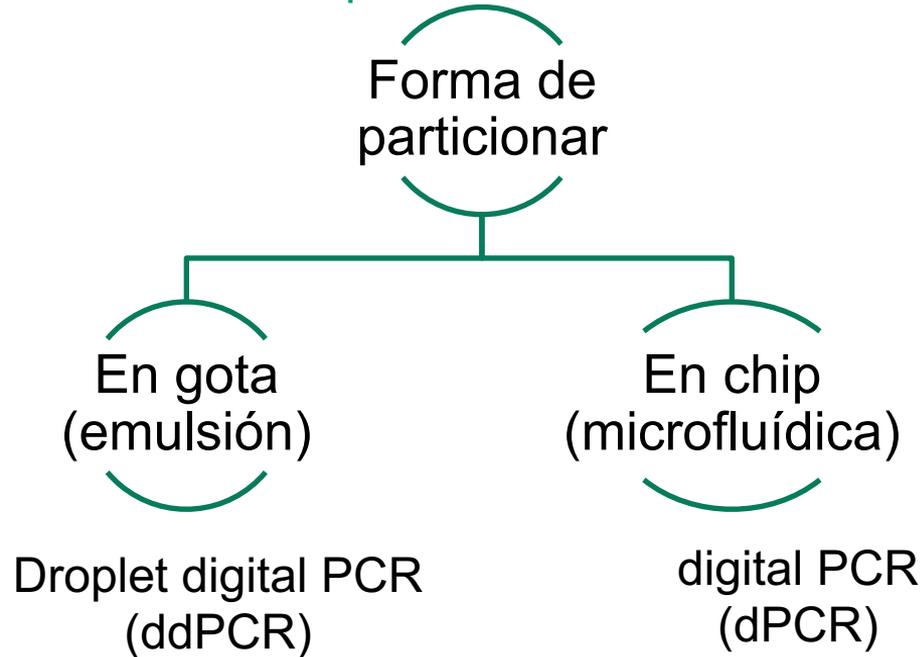


2) Similitudes y diferencias entre plataformas de dPCR

MISMO MECANISMO DE DETECCIÓN



2) Similitudes y diferencias entre plataformas de dPCR

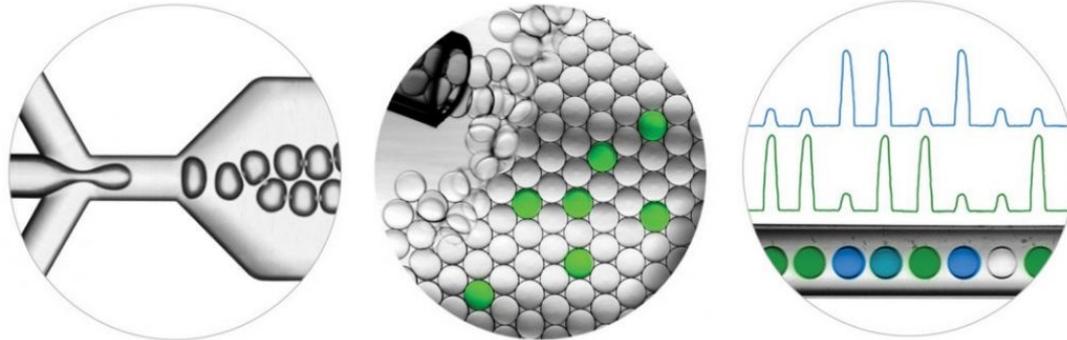


2) Similitudes y diferencias entre plataformas de dPCR

Tecnología de PCR digital en gota (ddPCR)

La PCR digital en gota (ddPCR) es un método para realizar PCR digital que se basa en la tecnología de gotas de **emulsión agua-aceite**. Una muestra se fracciona en 20.000 gotas, y la amplificación por PCR de los moldes ocurre en cada gota individual. La tecnología ddPCR utiliza reactivos y flujos de trabajo similares a los utilizados para la mayoría de los ensayos estándar basados en sondas TaqMan.

La partición masiva de muestras es un aspecto clave de la técnica ddPCR





2) Similitudes y diferencias entre plataformas de dPCR



Droplet Digital PCR Systems

Bio-Rad's Droplet Digital PCR Systems provide ultrasensitive and absolute nucleic acid quantification.

QX600 Droplet Digital PCR System

Advanced 6-color multiplexing for up to 96 samples per run

QX600 AutoDG Droplet Digital PCR System

Advanced 6-color multiplexing for up to 96 samples per run for high-throughput analysis

QX ONE Droplet Digital PCR System

A high throughput multiplexed and integrated droplet digital PCR system

QX200 AutoDG Droplet Digital PCR System

For high-throughput analysis

QX200 Droplet Digital PCR (ddPCR) System

For analyzing up to 96 samples

Lector de
fluorescencia

Termociclador

Generador de gotas

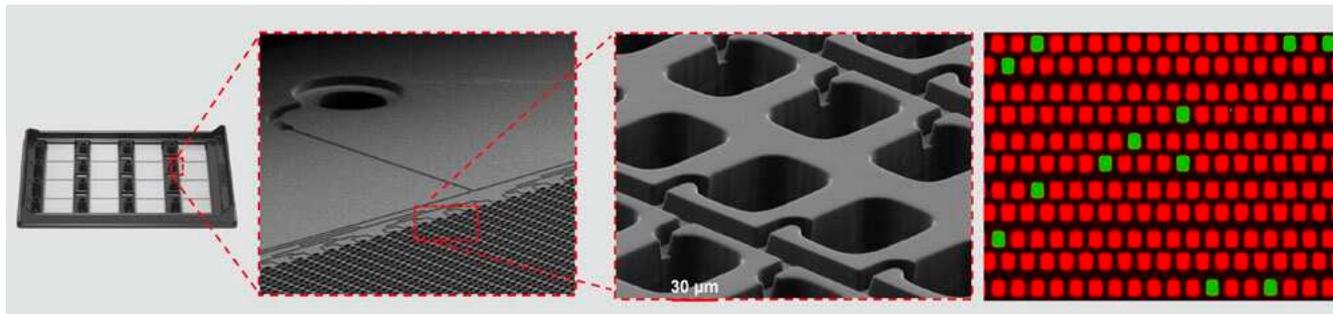


2) Similitudes y diferencias entre plataformas de dPCR

Tecnología de PCR digital en chip (microfluídica)

La PCR digital en chip (dPCR) es un método para realizar PCR digital usando arrays de miles de pocillos que permiten particionar (compartimentalización) la reacción en miles de microcámaras independientes.

La partición masiva de muestras es un aspecto clave de la técnica dPCR



2) Similitudes y diferencias entre plataformas de dPCR



Cargar chips
(manualmente)



Hasta 24 chips
simultáneos



(1ª generación)
QuantStudio 3D

Leer chips
(manualmente)

QuantStudio™ 3D
Digital PCR System Workflow



2) Similitudes y diferencias entre plataformas de dPCR

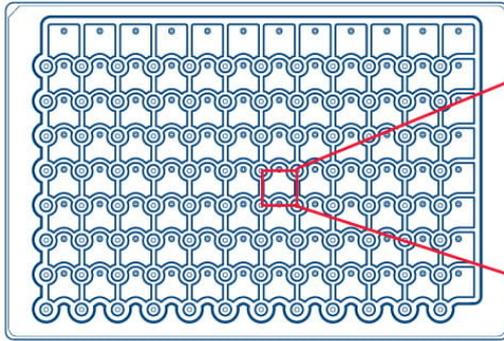
ThermoFisher
S C I E N T I F I C

(2ª generación)
QuantStudio AbsoluteQ

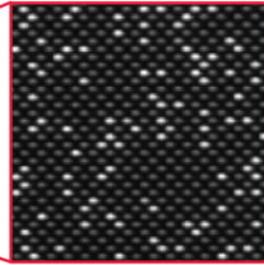




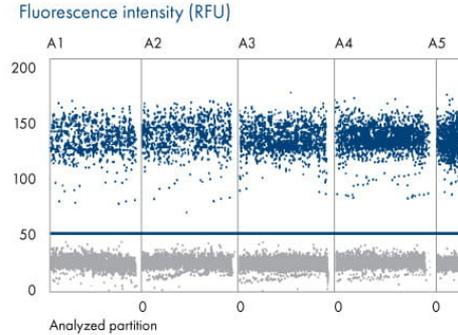
1) Similitudes y diferencias entre plataformas de dPCR



dPCR nanoplate with 96 wells



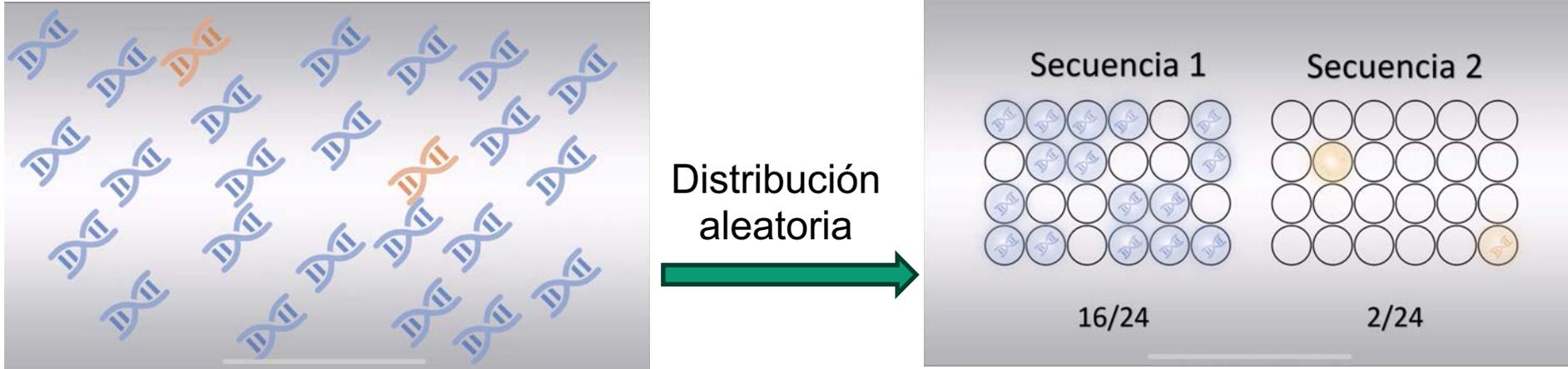
Single well detail



Analysis view (Representative 1D Scatterplot)



3) Análisis de resultados de dPCR

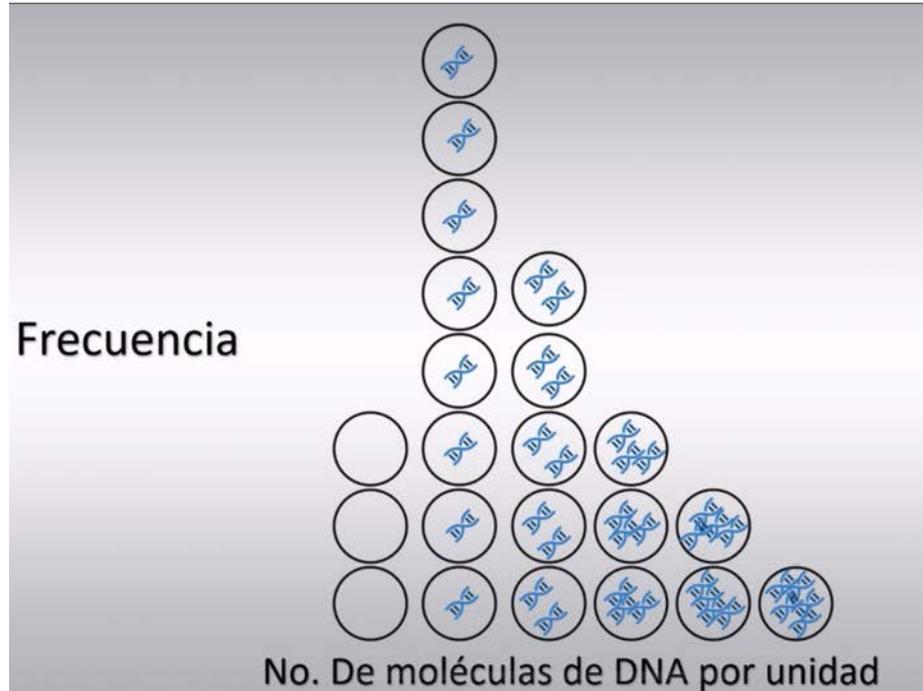
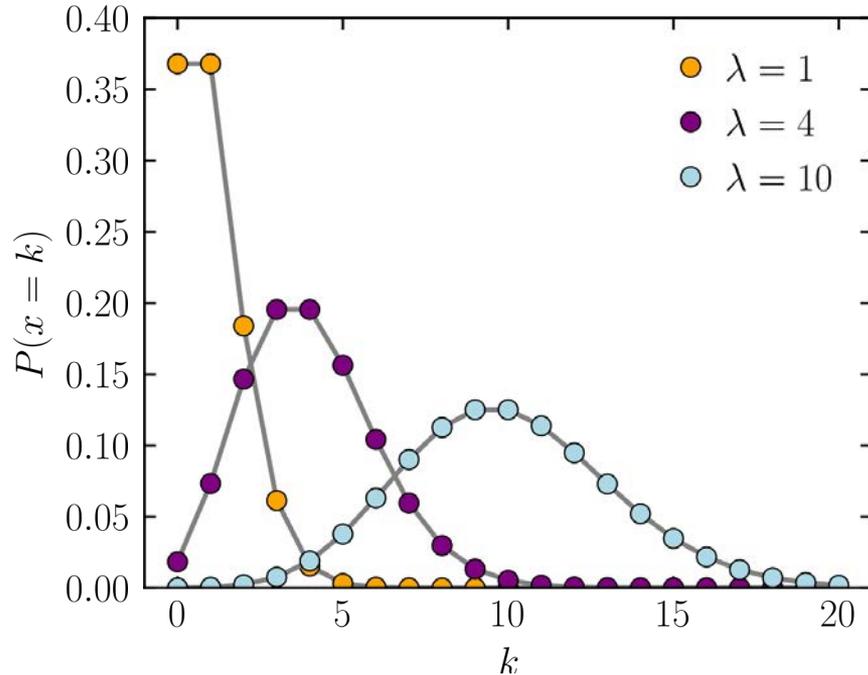


Cualquier molécula tiene las mismas probabilidades de acabar en una partición

La localización de una molécula es independiente del resto de moléculas

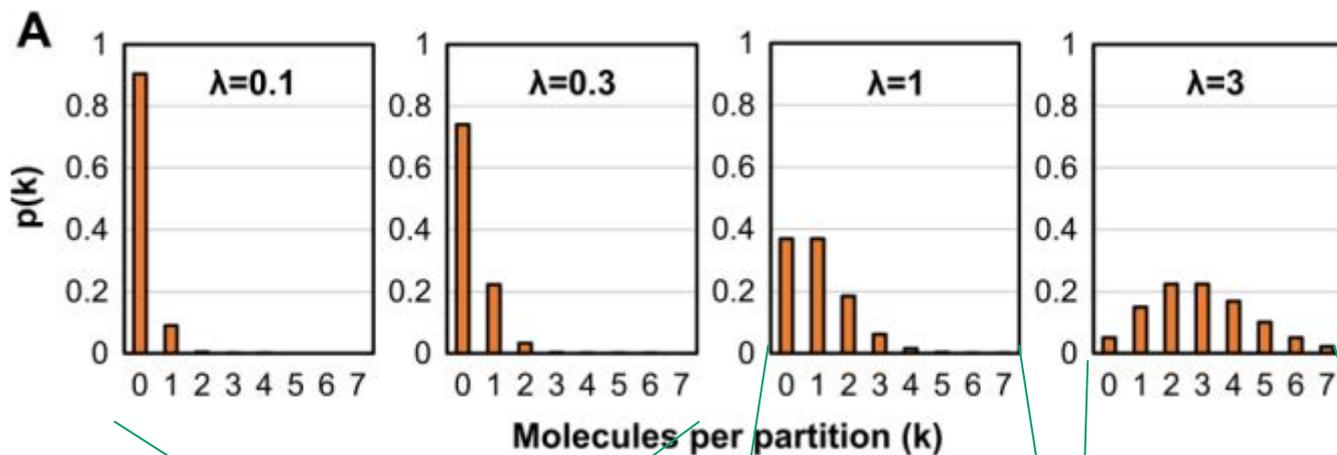
3) Análisis de resultados de dPCR

MODELO: Distribución de Poisson



3) Análisis de resultados de dPCR

MODELO: Distribución de Poisson



Concentración

Baja

Intermedia

Alta

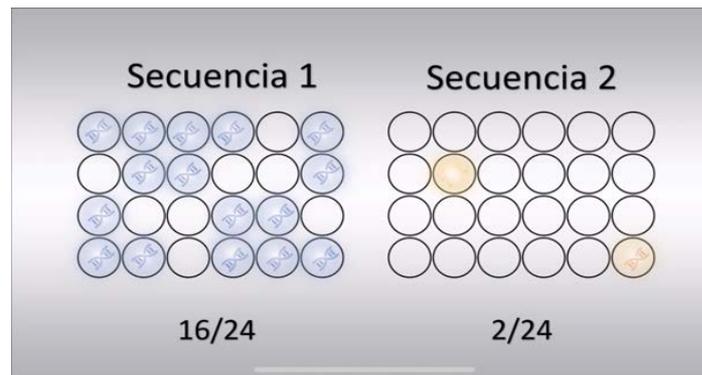
3) Análisis de resultados de dPCR

$$M = -\ln\left(1 - \left(\frac{P}{R}\right)\right)$$

M = Número promedio de moléculas *target* por partición

P = Número de particiones con el producto amplificado

R = Número de reacciones/particiones analizadas



Secuencia 1



$$M = -\ln\left(1 - \left(\frac{16}{24}\right)\right)$$

1.0986 moléculas por partición

Secuencia 2



$$M = -\ln\left(1 - \left(\frac{2}{24}\right)\right)$$

0.087 moléculas por partición

Secuencia 1



$$\frac{400 \mu\text{L}}{24 \text{ particiones}}$$

≈ 18 moléculas por μL de muestra

1.0986 moléculas por partición

Secuencia 2



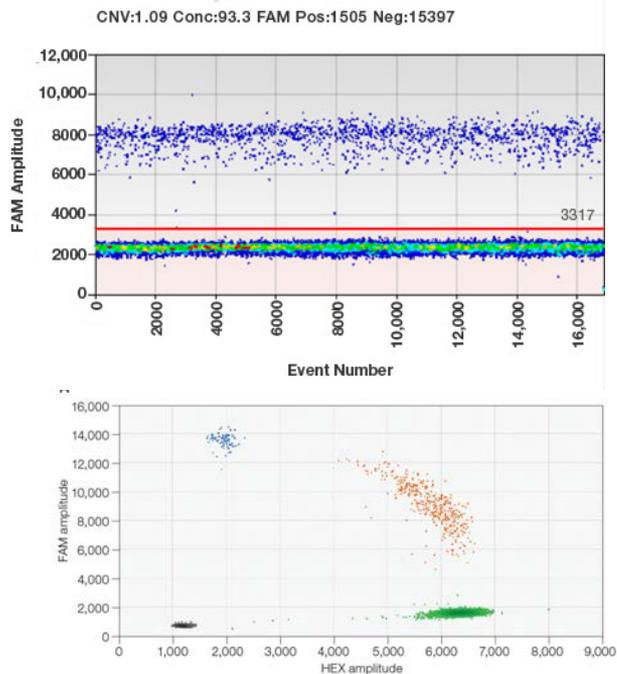
≈ 1.5 moléculas por μL de muestra

0.087 moléculas por partición

3) Análisis de resultados de dPCR

Visualización de resultados

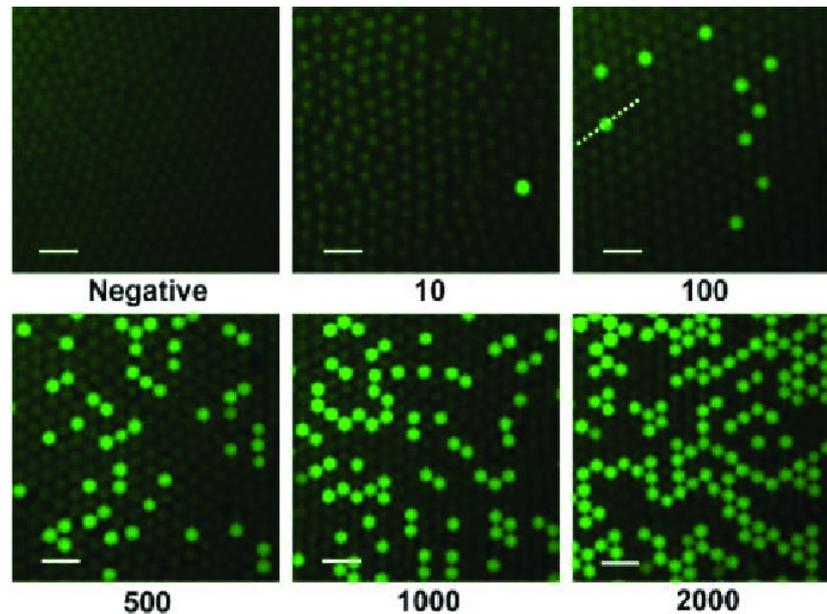
ddPCR (en gota)



1D plot

2D plot

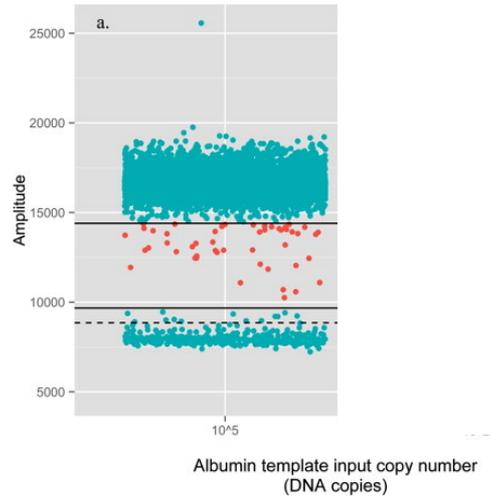
dPCR (en chip)



3) Análisis de resultados de dPCR

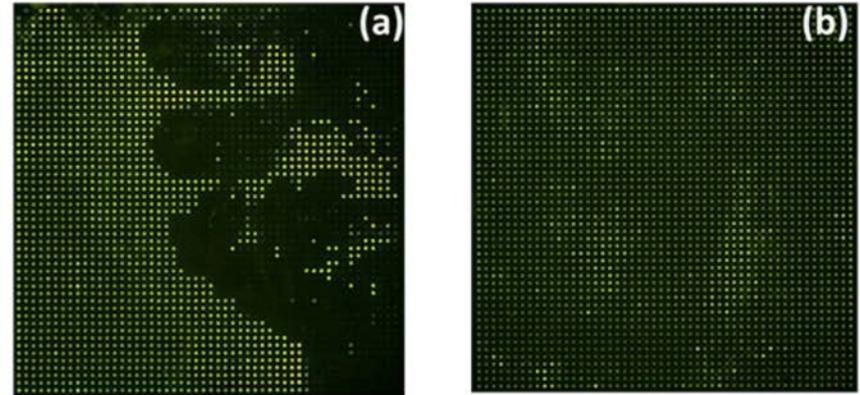
Visualización de resultados

ddPCR (en gota)



Reacciones sin clasificar

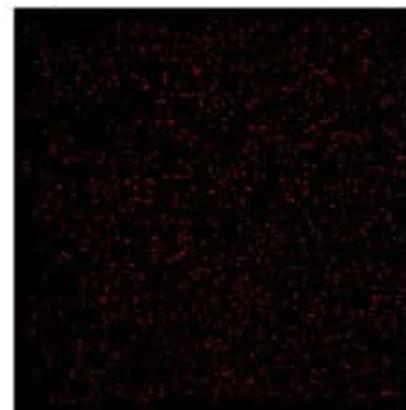
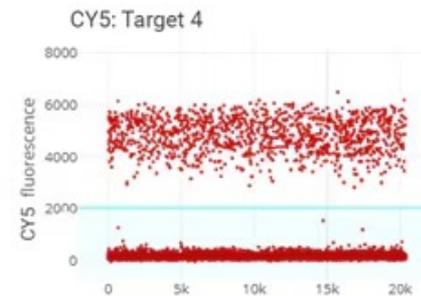
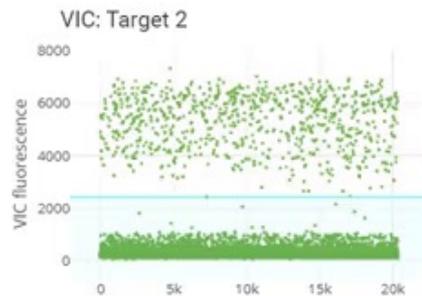
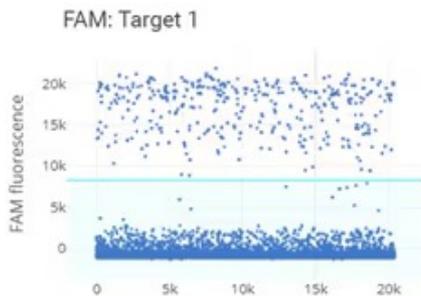
dPCR (en chip)



Problemas de carga de chip

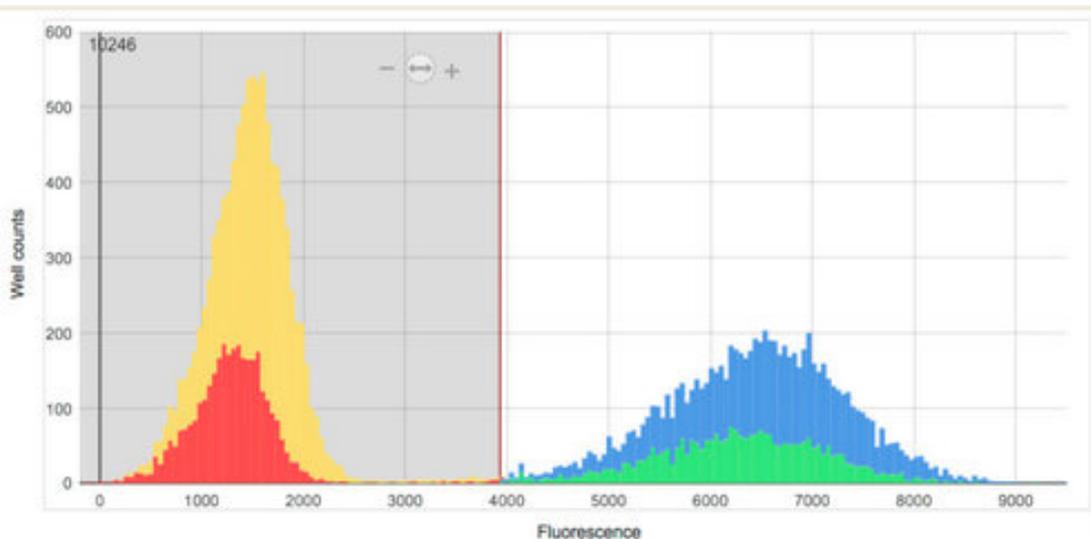
3) Análisis de resultados de dPCR

Visualización combinada

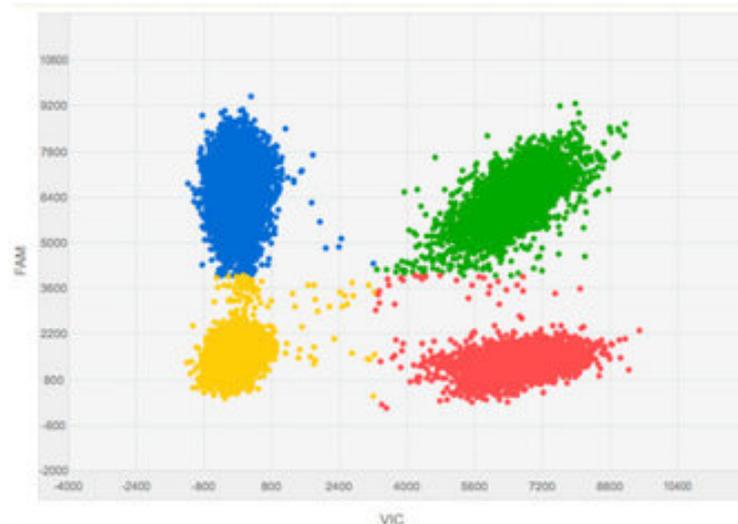


3) Análisis de resultados de dPCR

Histogramas y gráficos de nubes de puntos



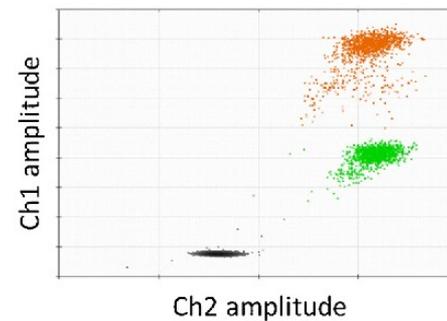
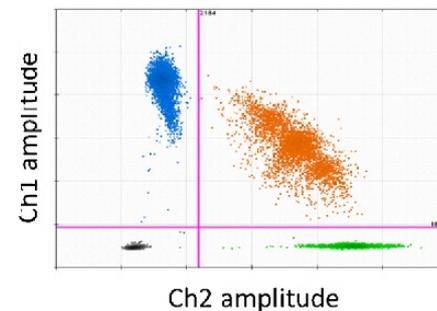
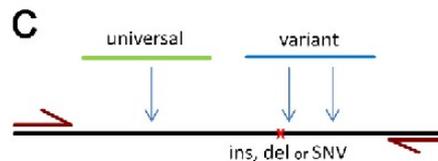
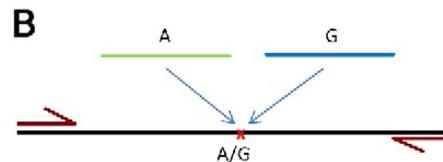
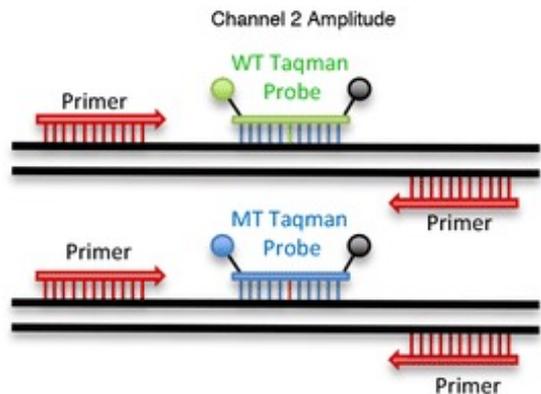
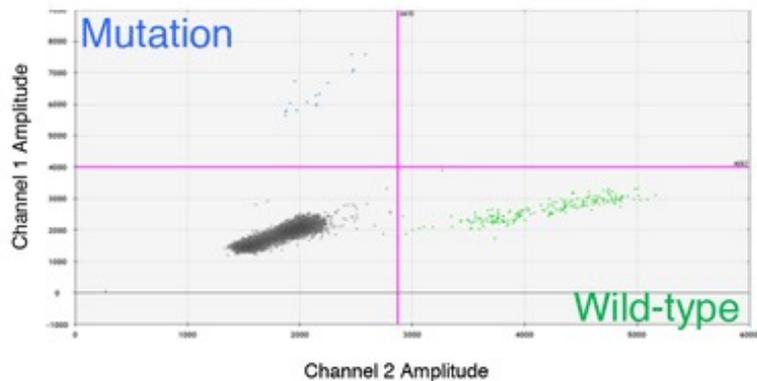
(a)



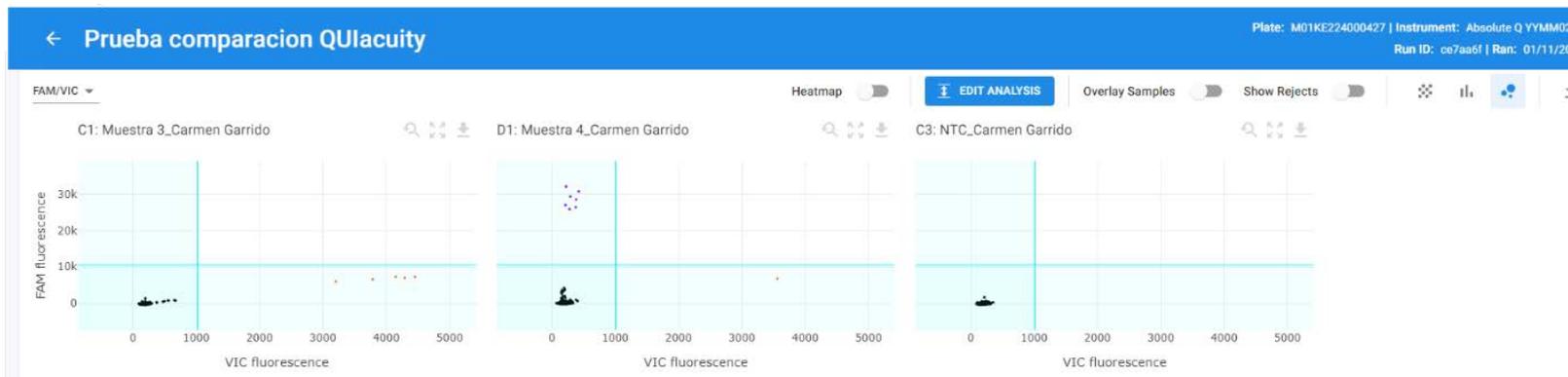
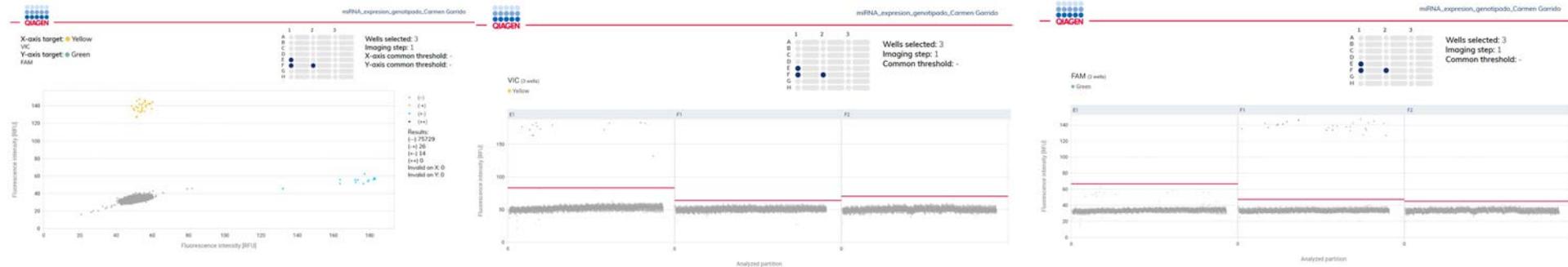
(b)

3) Análisis de resultados de dPCR

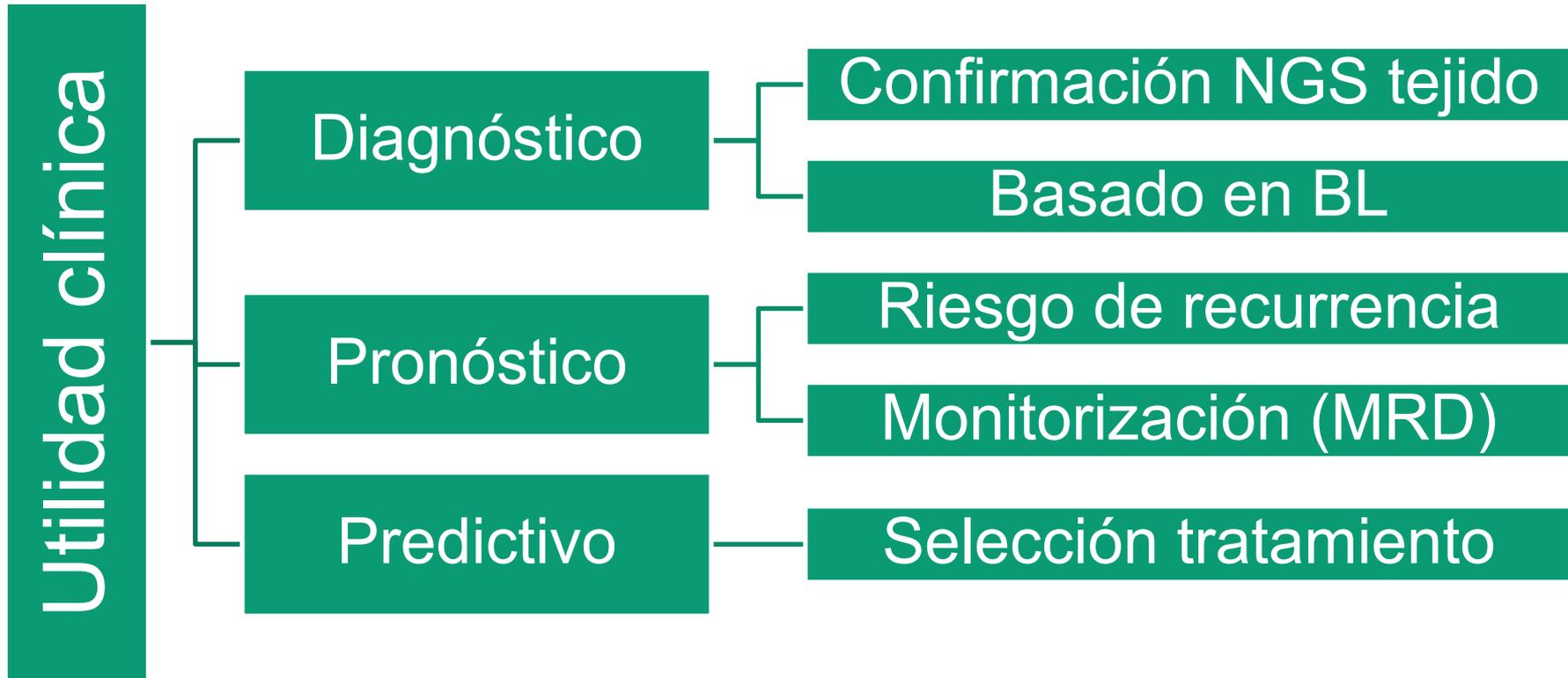
Tumor 2-T790M positive sample - Seki's, In-house & LT's primers



3) Análisis de resultados de dPCR

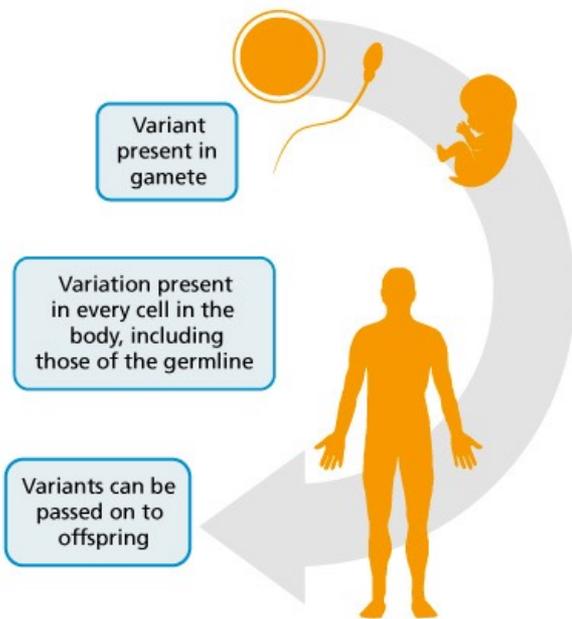


4) Aplicabilidad clínica y estudios observacionales de dPCR en cáncer

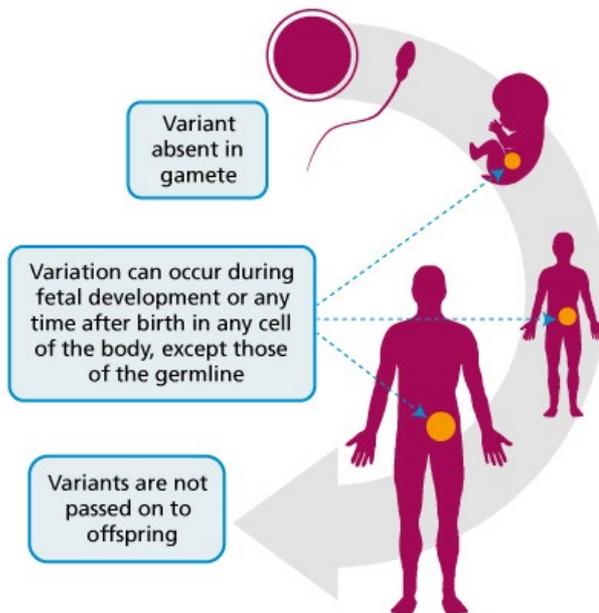


4) Aplicabilidad clínica y estudios observacionales de dPCR en cáncer

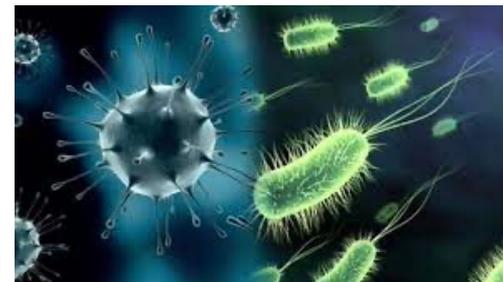
Variantes GERMINALES



Variantes SOMÁTICAS



Presencia VIRUS

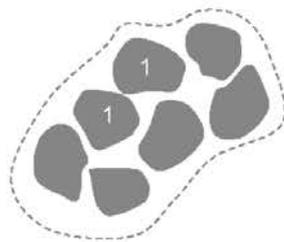


4) Aplicabilidad clínica y estudios observacionales de dPCR en cáncer

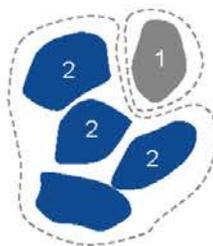
TUMOR SAMPLE HETEROGENEITY



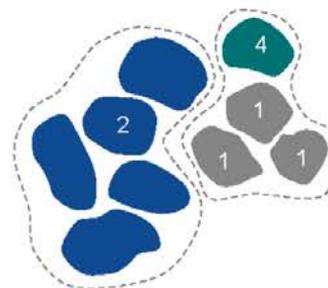
Homogenous sample
'healthy'
CN=2



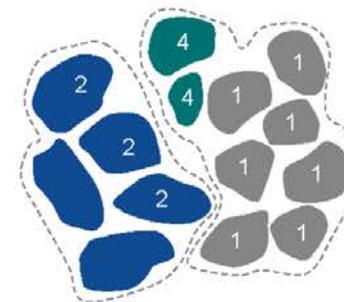
Homogenous sample
CN loss
CN=1



Heterogenous sample
CN loss
CN net=10%loss



Heterogenous sample
CN loss and gain
CN net= No change



Heterogenous sample
CN loss and gain
CN net= 10% loss

CN LOSS	Healthy cells, CN=2	Altered cells, CN=1	Resolution needed
% of cells	50%	50%	25%
	80%	20%	10%

CN GAIN	Healthy cells, CN=2	Altered cells, CN=10	Resolution needed
% of cells	90%	10%	40%
	97.5%	2.5%	10%

Fine resolution and high quantitative power is needed!



4) Aplicabilidad clínica y estudios observacionales de dPCR en cáncer

Dificultades en el uso de dPCR para biopsias líquidas:

- La proporción de ctDNA vs total cfDNA es muy baja (especialmente en estadios tempranos) → necesario tecnologías muy sensibles
- Extracción de cfDNA → eficiencia de la tecnología (basado en beads magnéticas ligeramente superior calidad a basado en membranas)
- Protocolos preanalíticos: forma de extraer el plasma, centrifugaciones, conservación → pureza de la muestra → reproducibilidad



4) Aplicabilidad clínica y estudios observacionales de dPCR en cáncer



EGFR mutations digital PCR detection kit

The EGFR mutations digital PCR detection kit is designed based on droplet digital PCR technology and TaqMan fluorescent probe technology to specifically detect the...

[Learn More +](#)



ALK/ROS1/MET gene fusions and mutations digital PCR detection kit

Specifically detect the mutations of ALK, ROS1, MET gene in paraffin-embedded tissue samples from patients with non-small cell lung cancer.

[Learn More +](#)



KRAS/BRAF/NRAS/PIK3CA mutations digital PCR detection kit

The KRAS/BRAF/NRAS/PIK3CA mutations digital PCR detection kit is designed based on droplet digital PCR technology and TaqMan fluorescent probe technology to...

[Learn More +](#)



TERT/BRAF mutations digital PCR detection kit

The TERT/BRAF mutations digital PCR detection kit is a digital PCR assay for qualitative detection of TERT and BRAF gene mutations, including TERT gene promoter...

[Learn More +](#)



4) Aplicabilidad clínica y estudios observacionales de dPCR en cáncer

EGFR mutation detection



EGFR mutation detection in NSCLC FFPE samples using Crystal Digital PCR® and Nio™+ system

[Read Application Note](#) →



Detection of EGFR Mutations in Plasma cfDNA and Paired CTCs of NSCLC Patients before and after Osimertinib Therapy Using Crystal Digital PCR

[Read Publication](#) →



High multiplex, ultrasensitive EGFR detection using the EGFR 6-color Crystal Digital PCR Kit

[Read Application Note](#) →



Detection of EGFR mutations in plasma cfDNA and CTCs of NSCLC patients using Crystal Digital PCR™

[Watch Webinar On-Demand](#) →

ESR1 mutation detection



ESR1 mutation detection in FFPE and Plasma DNA of breast cancer patients using Crystal Digital PCR® and Nio™+.

[Read Application Note](#) →

Other indications



Detection of oncogenic mutations in paired circulating tumor DNA and circulating tumor cells in patients with hepatocellular carcinoma

[Read Publication](#) →



A detection of hypermethylated circulating tumor DNA by Crystal Digital PCR

[Read Application Note](#) →

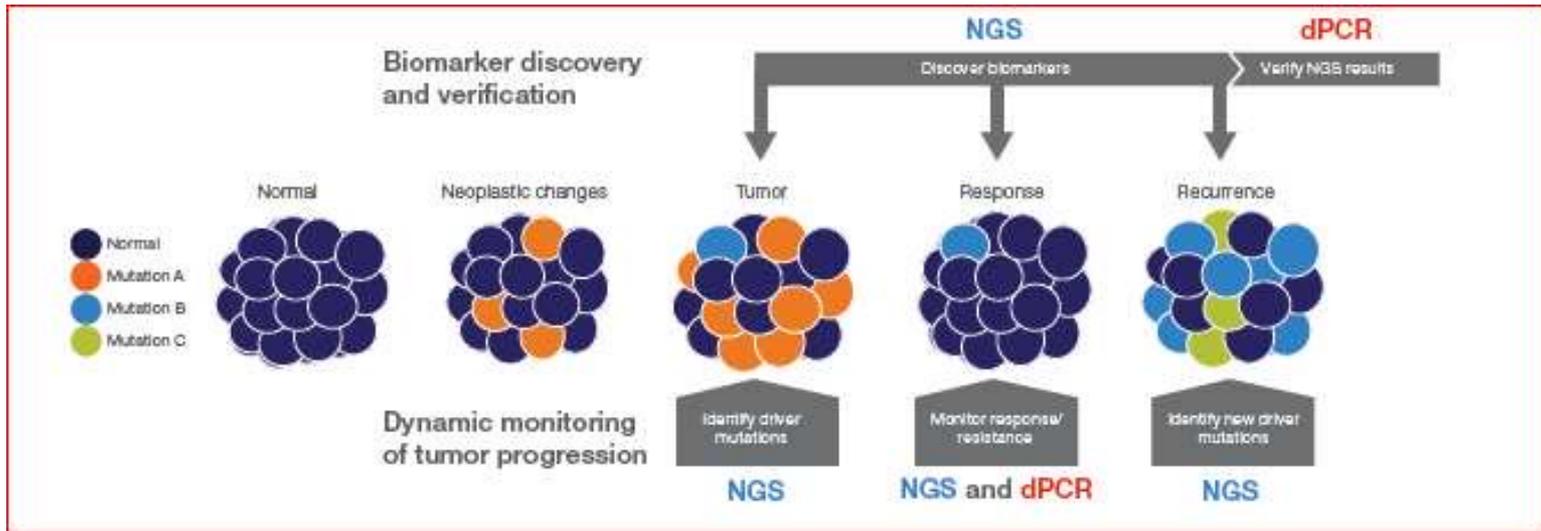


An ultrasensitive high-plex assay detection 24 PIK3CA mutations using SAGAsafe technology and 6-color Crystal Digital PCR

[View Poster](#) →

4) Aplicabilidad clínica y estudios observacionales de dPCR en cáncer

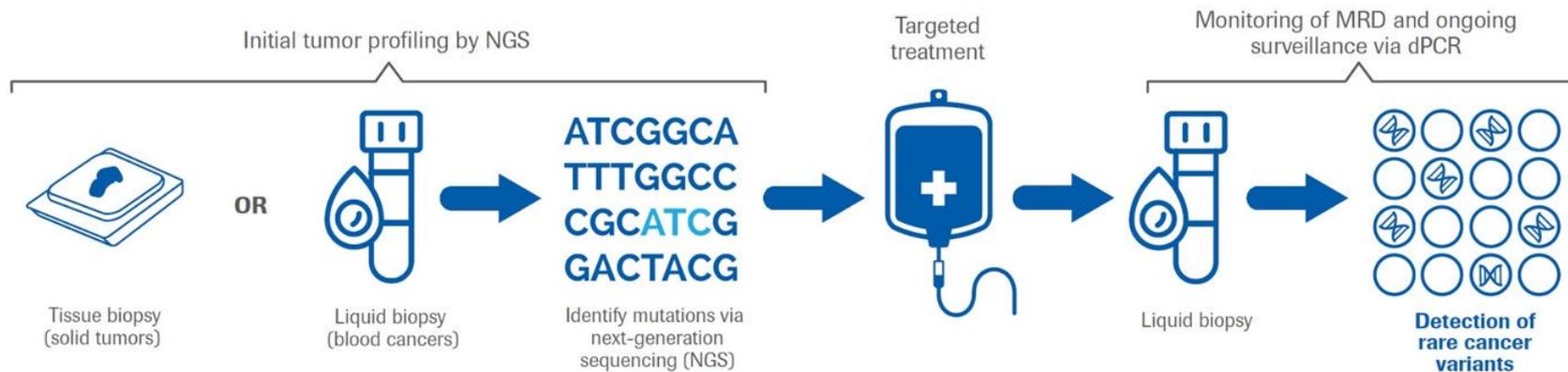
Comparación con NGS y heterogeneidad tumoral



4) Aplicabilidad clínica y estudios observacionales de dPCR en cáncer

Combinación de NGS y dPCR para monitorización

Overview of how dPCR can be used to detect MRD



4) Aplicabilidad clínica y estudios observacionales de dPCR en cáncer

Heliyon

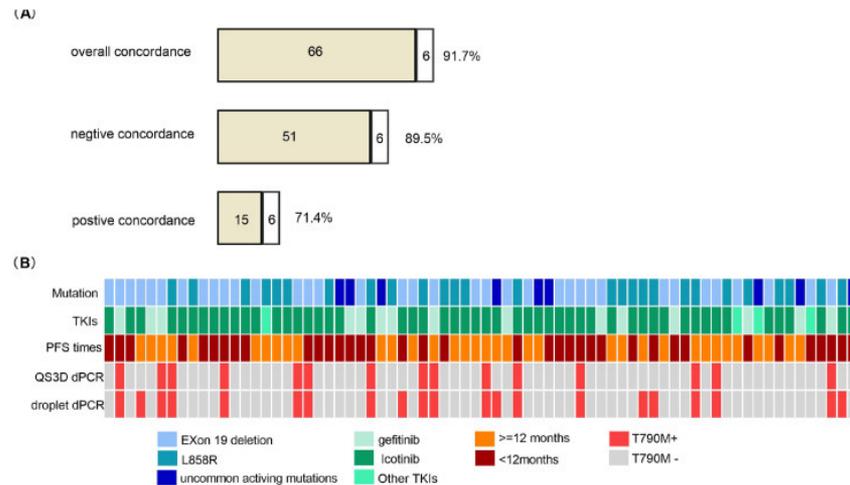
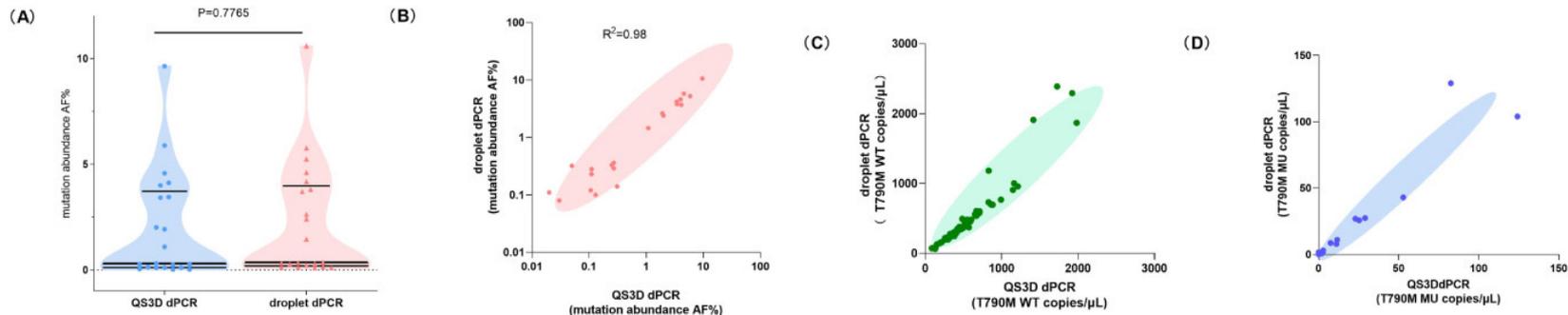


Volume 8, Issue 11, November 2022, e11339

Research article

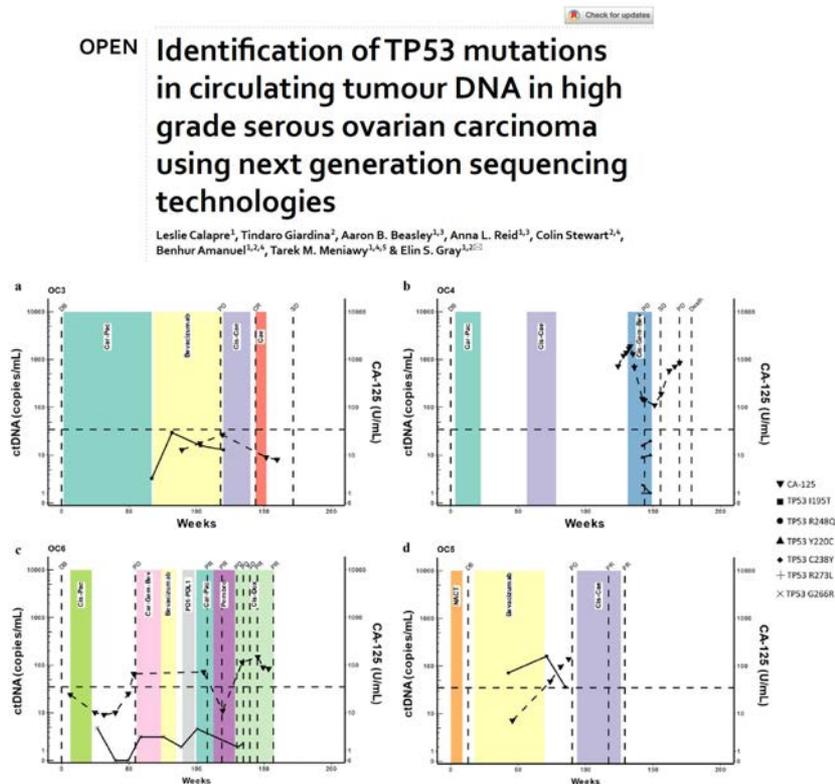
Comparative analysis of QS3D versus droplet digital PCR for quantitative measures of EGFR T790M mutation from identical plasma

Qiaomei Guo^{a, b, 1}, Lin Wang^{a, 1}, Xiaohui Liang^{a, 1}, Mingna Zhao^a, Xia Huang^b, Wanxing Xu^a, Jiatao Lou^a, Lihua Qiao^a



4) Aplicabilidad clínica y estudios observacionales de dPCR en cáncer

scientific reports



Patient ID	Gene	Mutation	Chromosomal position	Oncomine panel	ddPCR validation
OC1	TP53	p.R282G	17:7,577,094	0.54%	0.7%
		p.G266R	17:7,577,142	0.03% ^a	0.02%
OC2	TP53	p.R273H	17:7,577,120	0.04%	–
OC3	TP53	p.I195T	17:7,578,265	0.03% ^a	0.03%
		p.N13N	17:7,579,757	b	–
OC4	TP53	p.R282W	17:7,577,094	0.10%	0.7%
		p.R273L	17:7,577,120	0.10%	–
		p.R248Q	17:7,577,538	0.86%	0.50%
		p.C238Y	17:7,577,568	0.38%	0.10%
		p.Y220C	17:7,578,190	0.28%	0.25%
		p.R280S	17:7,577,100	2%	3%
OC5	TP53	p.T253P	17:7,577,524	–	–
		p.R282W	17:7,577,094	0.04%	0.04%
OC6	TP53	p.I195T	17:7,578,265	0.86%	0.83%
		p.G266R	17:7,577,142	0.04%	0.11%
OC7	TP53	p.S378fs	17:7,572,976	0.08%	c
OC8	TP53	p.R196Q	17:7,578,262	0.29%	c
		p.S185G	17:7,578,377	–	–
		p.D184H	17:7,578,380	–	–
OC9	TP53	p.Y234C	17:7,577,580	0.04%	–
OC10	TP53	p.R273C	17:7,577,121	0.25%	0.58%

4) Aplicabilidad clínica y estudios observacionales de dPCR en cáncer

Molecular
Oncology

2023

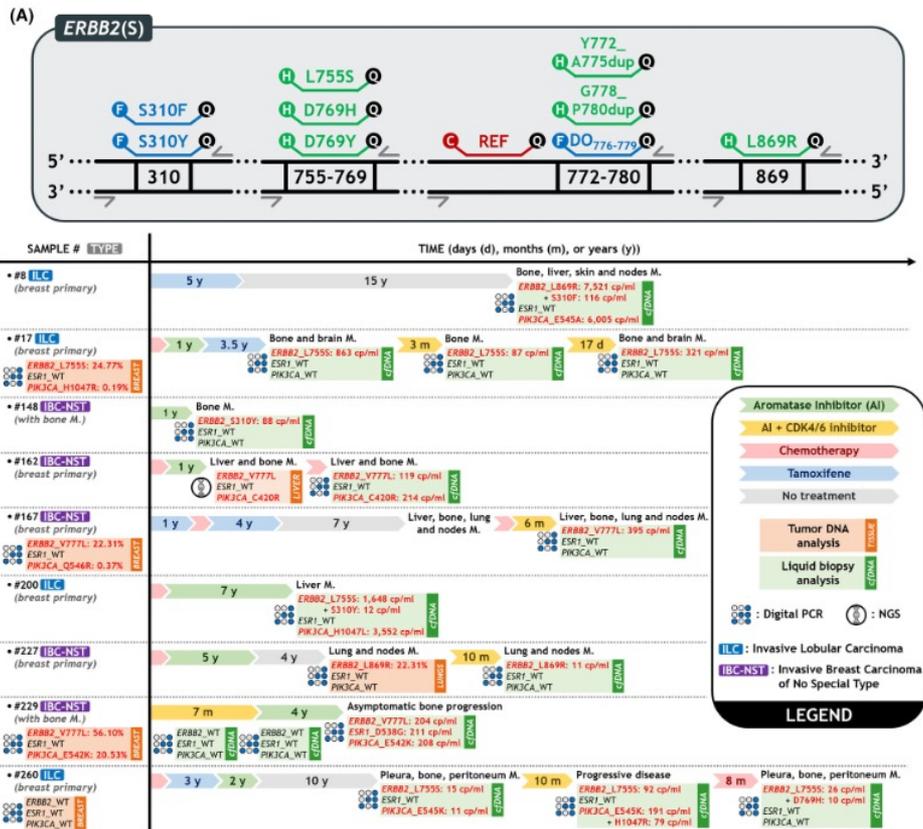
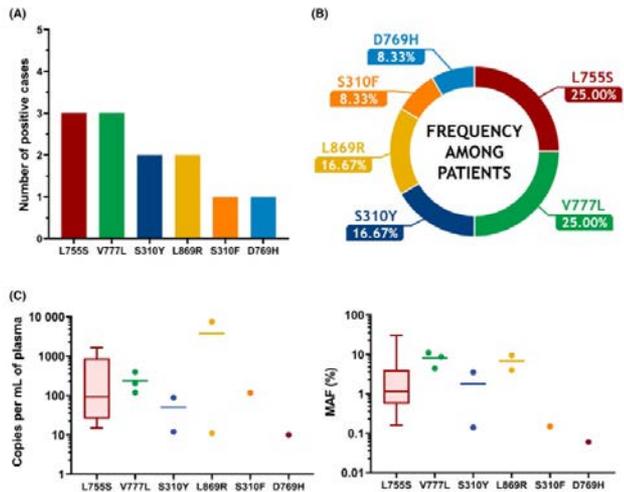
Plasma-based analysis of *ERBB2* mutational status by multiplex digital PCR in a large series of patients with metastatic breast cancer

Julien Corné¹, Véronique Quillien^{1,2,3}, Florence Godey^{1,2,3}, Mathilde Cherel¹, Agathe Cochet², Fanny Le Du², Lucie Robert², Héloïse Bourien², Angélique Brunot², Laurence Crouzet², Christophe Perrin², Claudia Lefeuvre-Plesse², Véronique Diéras² and Thibault De la Motte Rouge²

1 Department of Biology, Centre Eugène Marquis, Unicancer, Rennes, France

2 Department of Medical Oncology, Centre Eugène Marquis, Unicancer, Rennes, France

3 INSERM U1242, University of Rennes, France



4) Aplicabilidad clínica y estudios observacionales de dPCR en cáncer

The Journal of Molecular Diagnostics, Vol. 26, No. 4, April 2024



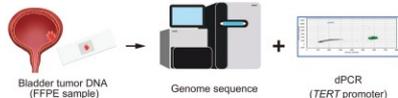
the Journal of
Molecular
Diagnostics

jmdjournal.org

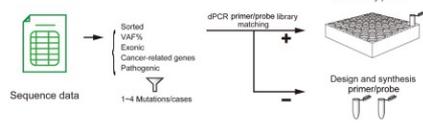
The Clinical Validity of Urinary Pellet DNA Monitoring for the Diagnosis of Recurrent Bladder Cancer

Masakazu Abe,^{1†} Hayato Hiraki,^{2†} Takashi Tsuyukubo,³ Sadahide Ono,³ Shigekatsu Maekawa,⁴ Daichi Tamura,⁵ Akiko Yoshima-Abe,⁶ Rengei Kato,⁷ Hiromitsu Fujisawa,⁸ Takeshi Iwaya,⁹ Woong-Yang Park,^{10*} Masashi Ido,¹¹ Takashi Tokino,¹² Wataru Obara,¹³ and Satoshi S. Nishizuka¹⁴

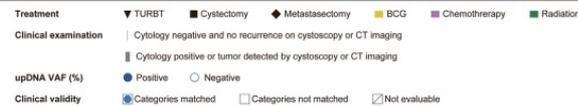
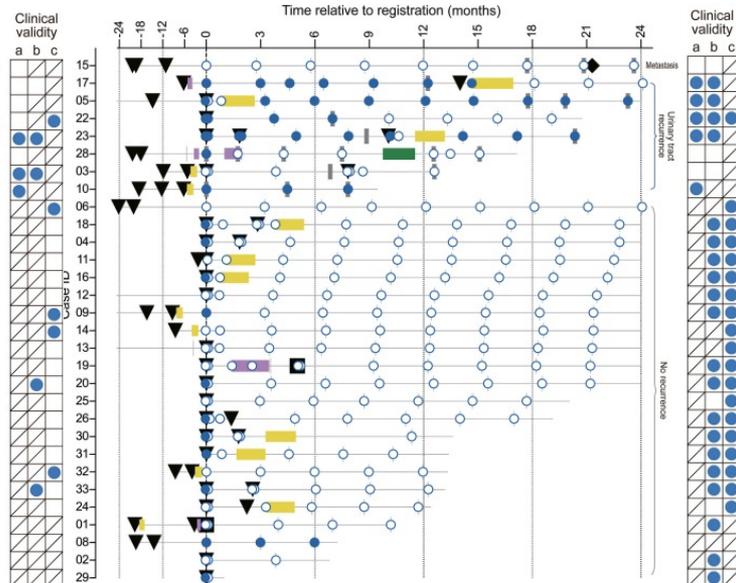
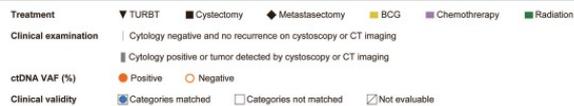
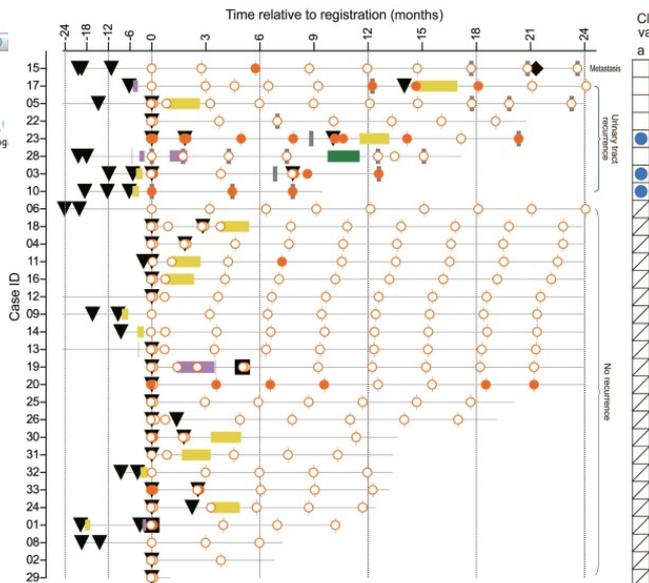
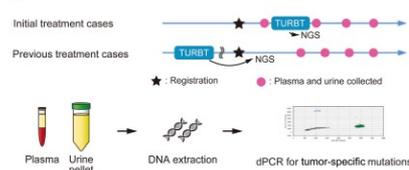
A



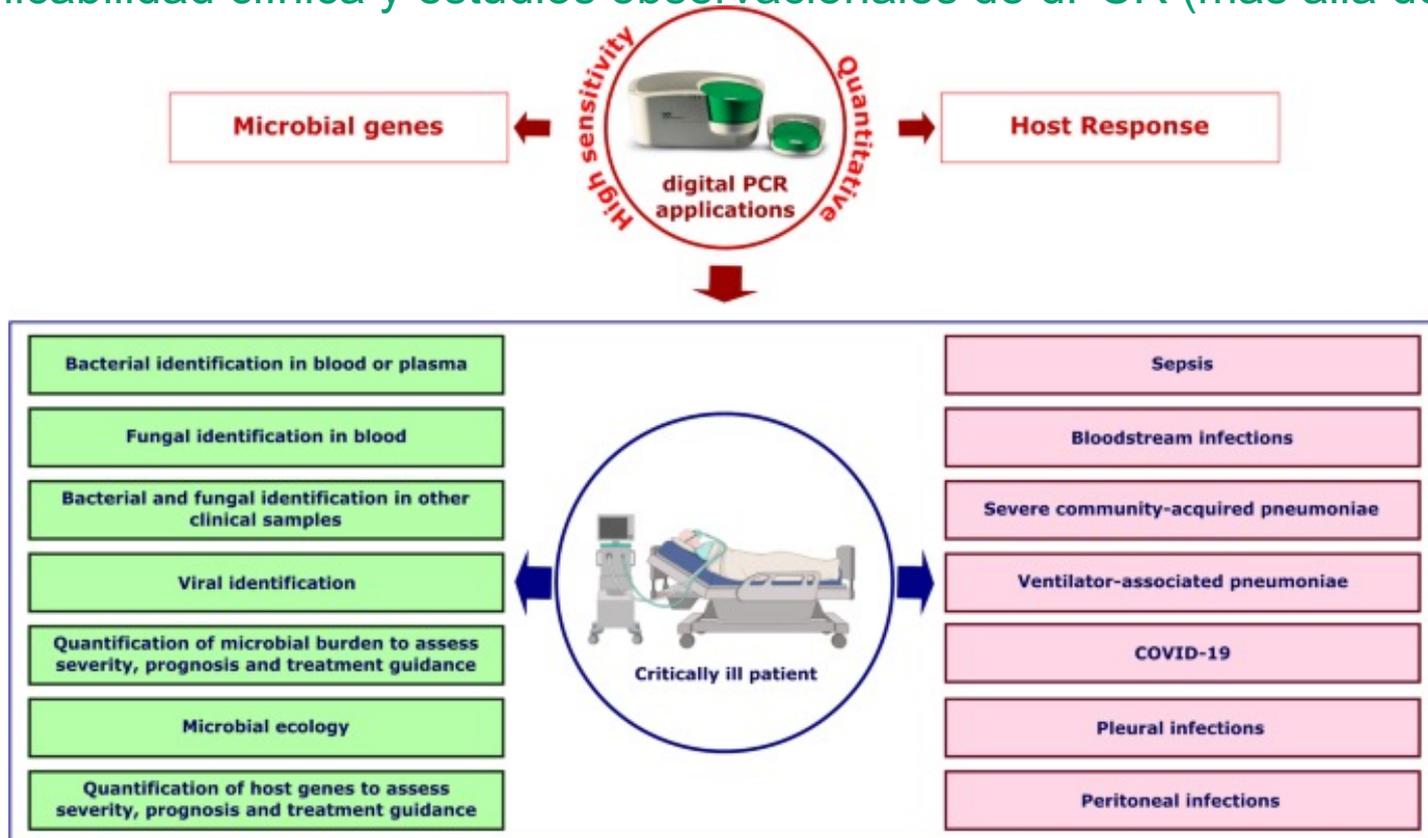
B



C



4) Aplicabilidad clínica y estudios observacionales de dPCR (más allá del cancer)



FORMACIÓN **IAVANTE** Fundación Progreso y Salud

CENTRO DE SIMULACIÓN CLÍNICA AVANZADA

@IAVANTE_FPS | #IAVANTEformación | www.IAVANTE.es



Gracias por su atención

www.IAVANTE.es

IAVANTE