



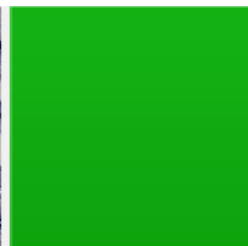
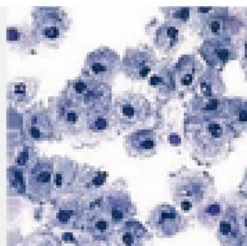
Новые молекулярно-генетические технологии в лабораторной практике. Дьявол прячется в деталях.

Филатова Людмила

К.б.н.

Владивосток,

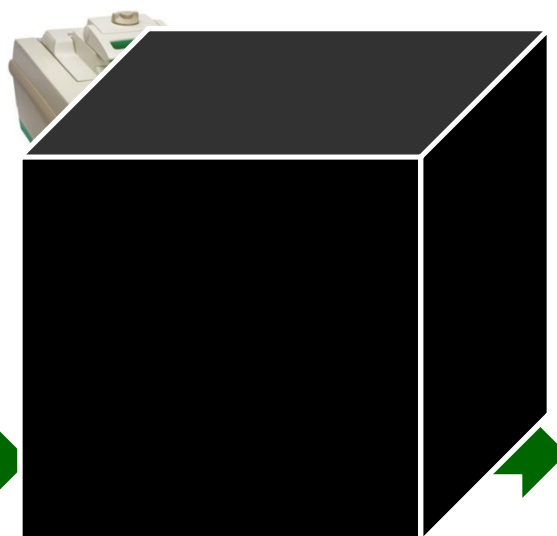
2015



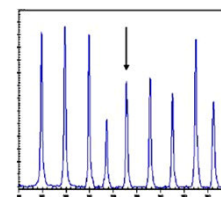
Процедура проведения анализа молекулярной диагностики



Выделение
ДНК



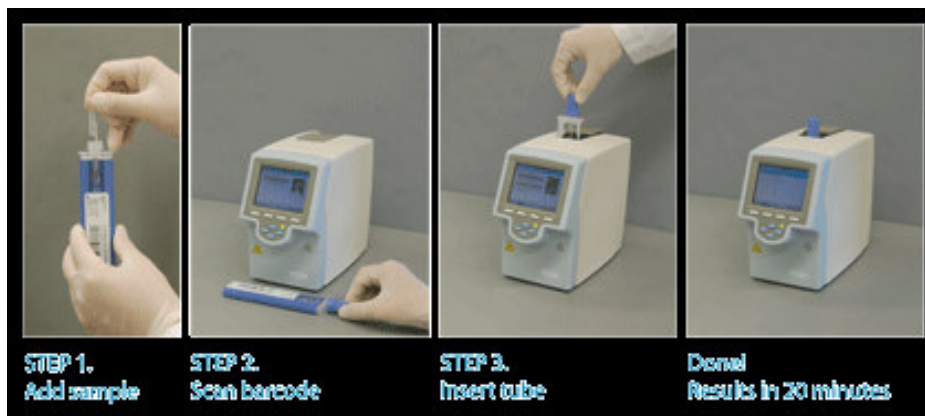
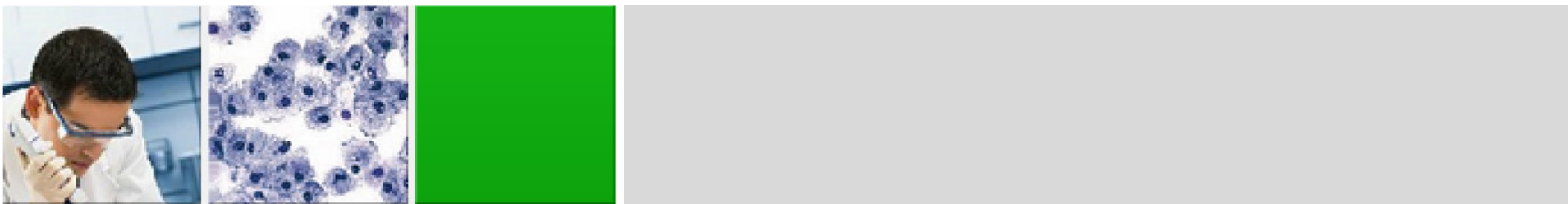
ПЦР



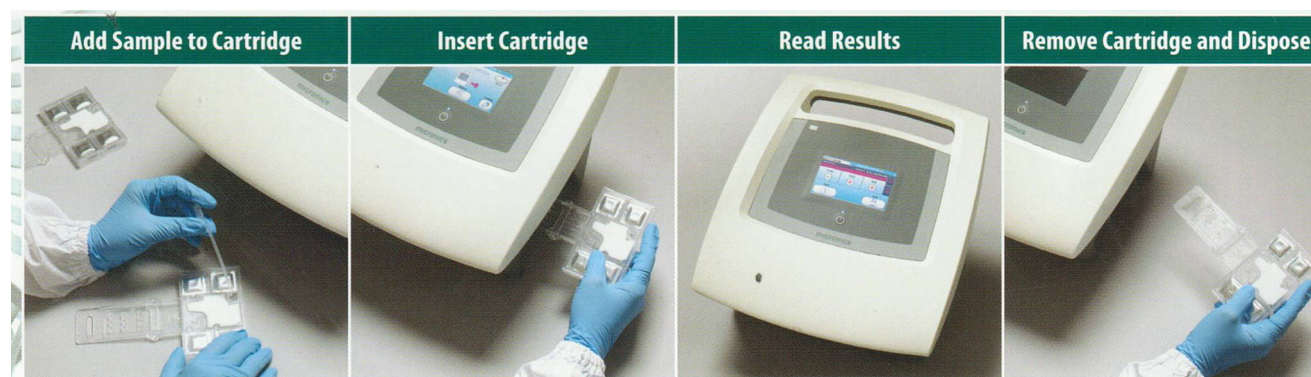
Детекция

HPV-HR				
Lot: 204771E51		ID: 2009071714514640		
		Sample:53		
SNo	Analyte	Analysis	RFU	Ratio
1.	HPV16	POSITIVE	954.28	3.02
2.	HPV18	neg	1.00	0.00
3.	HPV31	neg	30.85	0.10
4.	HPV33	neg	14.27	0.05
5.	HPV35	POSITIVE	856.60	2.71
6.	HPV39	neg	1.00	0.00
7.	HPV45	neg	1.00	0.00
8.	HPV51	POSITIVE	1058.41	3.35
9.	HPV52	neg	1.00	0.00
10.	HPV56	neg	1.00	0.00
11.	HPV58	neg	1.00	0.00
12.	HPV59	neg	21.75	0.07
3.	HPV66	neg	1.00	0.00
1.	HPV68	neg	1.00	0.00
7.	IC	POSITIVE	1602.97	5.07
6.	NEG	-	316.05	

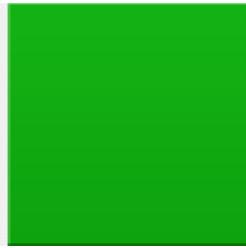
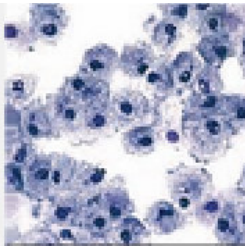




IQuum



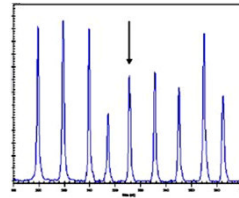
BCM
БИОХИММАК



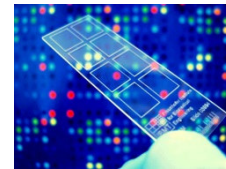
Основные тренды

Основные направления развития диагностических технологий, использующих ПЦР

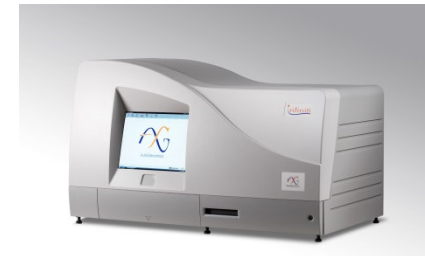
◆ Мультиплексный анализ



◆ Миниатюризация

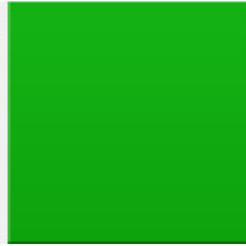
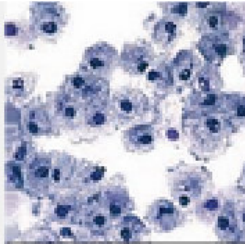


◆ Автоматизация



✓ *Повышение пропускной способности*

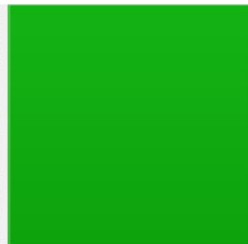
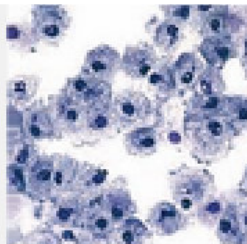
✓ *Снижение стоимости определения одного параметра/аналита*



Мультиплекс - MLPA

Перечень наборов MLPA для

- ♦ *Пренатальной и постнатальной диагностики*
- ♦ *Диагностики нейрогенетических заболеваний и врождённого слабоумия*
- ♦ *Диагностики наследственных видов рака*
- ♦ *Характеристики опухолей*
- ♦ *Фармакогенетики*
- ♦ *Наборы для определения статуса метилирования (эпигенетические заболевания, онкодиагностика)*



Мультиплекс - MLPA

MRC-Holland
MLPA

Как работает MLPA

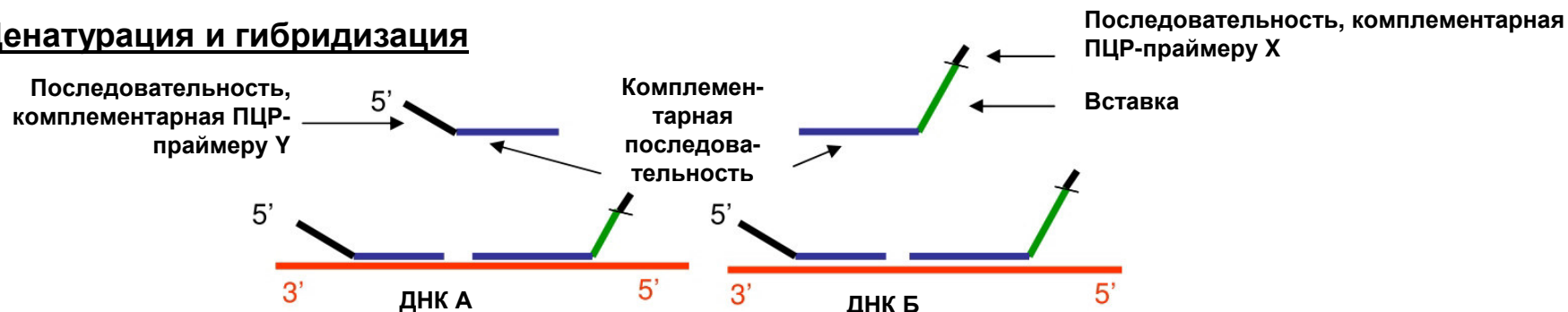
- ◆ Один зонд для MLPA состоит из двух олигонуклеотидов.
- ◆ Если последовательность, комплементарная зонду, присутствует в образце, то оба олигонуклеотида гибридизуются друг за другом.
- ◆ Гибридизованные олигонуклеотиды сшивает лигаза.
- ◆ Лигированные олигонуклеотиды становятся единым зондом и амплифицируются в ПЦР. Происходит амплификация не нуклеиновых кислот образца, а зонда.
- ◆ ПЦР характеризуется высокой воспроизводимостью, поскольку в реакции принимает участие только одна пара праймеров для амплификации всех зондов.
- ◆ Каждый зонд образует продукт амплификации уникальной длины.
- ◆ Продукты амплификации (размеры от 130 до 480 нуклеотидов) анализируют методом капиллярного электрофореза.
- ◆ Различия в относительных количествах последовательностей ДНК отражаются на высоте соответствующих пиков в референсном и исследуемом образцах.

ВСМ
БИОХИММАК

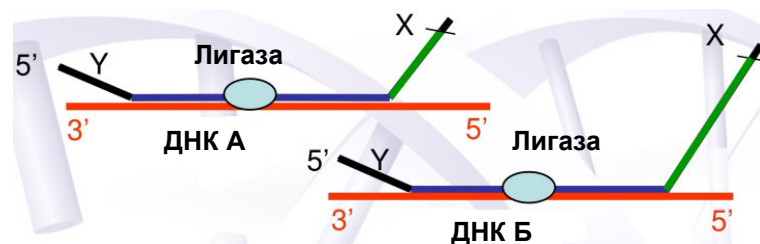


Метод MLPA (мультиплексная амплификация зонда, синтезируемого лигазой),

1. Денатурация и гибридизация



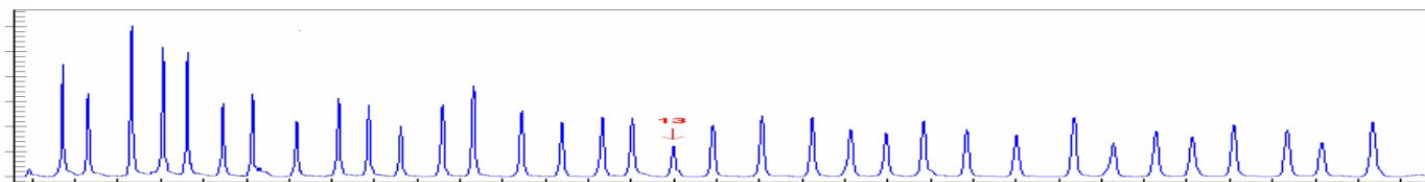
2. Лигирование



3. ПЦР



4. Разделение ампликонов капиллярным электрофорезом



MRC-Holland



ГРУППА КОМПАНИЙ

BCM

БИОХИММАК



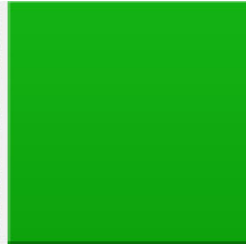
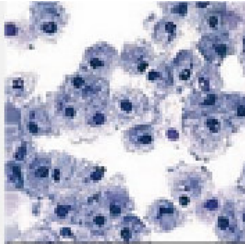
Необходимое оборудование

- ◆ Амплификатор и секвенатор. Стандартное общелабораторное оборудование для ПЦР-работ
- ◆ Получение результата в течение 24 часов.
- ◆ До 96 образцов исследуются в одном эксперименте.



+

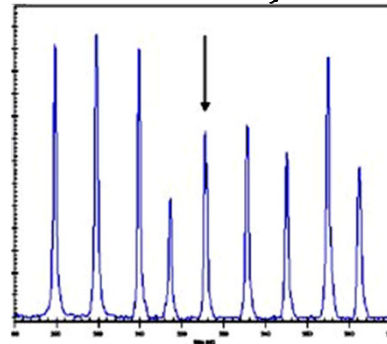




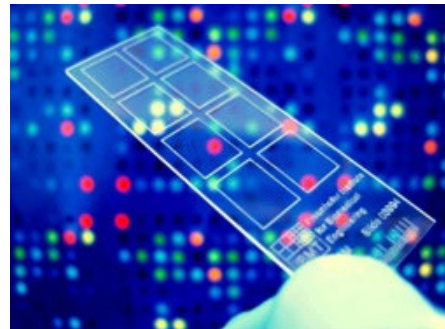
Основные тренды

Основные направления развития диагностических технологий, использующих ПЦР

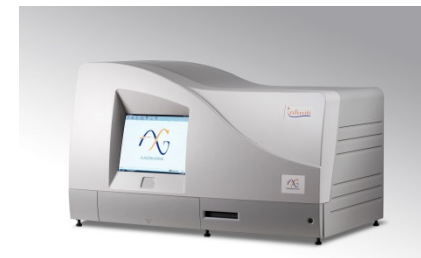
◆Мультиплексный анализ

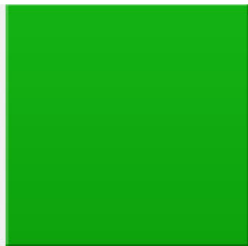
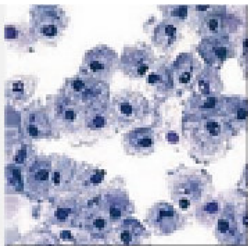


◆Миниатюризация



Автоматизация





Миниатюризация

Система MutaCHIP - мультиплексный анализ на макрочипах

Иммун
Диагностик

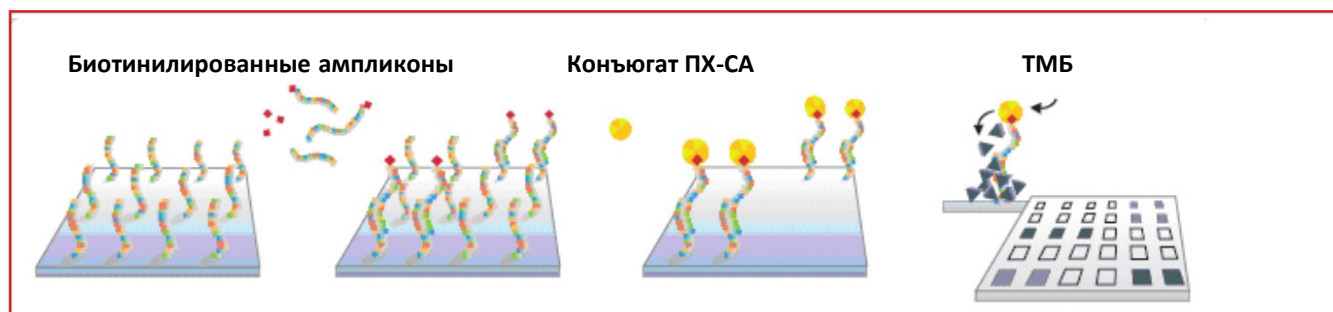
1. ПЦР (~1.5 часа)



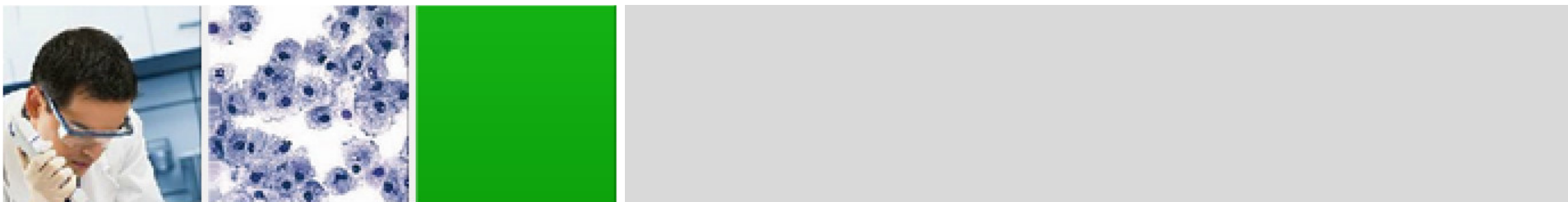
2. Гибридизация (2 часа)



3-4. Автоматическая детекция и интерпретация результатов (1 мин)



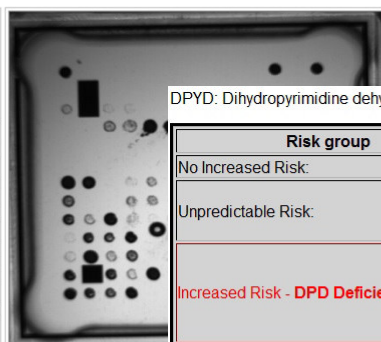
ВСМ
БИОХИММАК



DPYD Genotyping

Genetic Variation	Homozygous Wildtype	Heterozygous	Homozygous Mutation
*2A		▲	
*3	✓		
*4	✓		
*7	✓		
*8	✓		
*10	✓		
*12	✓		
*13	✓		
A551T	✓		
M166V		▲	
D949V	✓		

Increased Risk



DPYD: Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD) gene analysis identified 2 mutations.

Risk group	Assessment
No Increased Risk:	There is no increased risk of 5-FU induced toxicity based on a genetic predisposition.
Unpredictable Risk:	On the basis of the current state of literature, no definite risk classification can be made. Accordingly, the risk of 5-FU induced toxicities cannot be excluded based on the detected genetic predisposition. A close patient monitoring is strongly recommended.
Increased Risk - DPD Deficiency:	Based on the detected genetic predisposition an increased risk of 5-FU induced toxicities is existing. 5-FU dose reductions of 75-50 % should be carefully taken into consideration (22) and a close patient monitoring is strongly recommended. In addition, 5-FU plasma concentration measurements can be performed by HPLC to determine an individual dose for the patient to reduce the risk (23).
Highly Increased Risk - DPD Deficiency:	Based on the detected genetic predisposition a highly increased risk of 5-FU induced toxicities is existing. A 5-FU based therapy is contraindicated. It is recommended, to treat the patient with non fluoropyrimidine based agents like Irinotecan, Oxaliplatin and Raltitrexed (24).
Important! The final therapeutic decision is always on behalf of the attending physician.	

Notes:

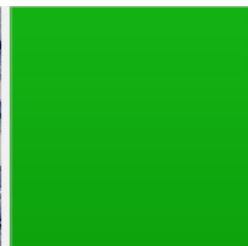
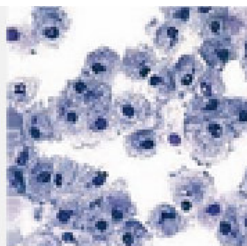
DPYD*2A: This mutation is by far the most relevant variant (1). A correlation between genotype and phenotype is very well described and shown in various studies. The *2A allele represents a G to A mutation in the GT '5' splicing recognition sequence of intron 14, which results in a 165-bp deletion (corresponding to exon 14) in the DPD mRNA. Several studies have demonstrated that heterozygous or homozygous prevalence of IVS14+1G>A mutation are associated with a deficiency of the DPD activity and are responsible for about 24 % to 28 % of grade 3 and 4 cases of 5-FU-induced toxicity (2, 3, 4). It is the most common mutation associated with 5-FU toxicity in Europeans, with a frequency as high as 2.2 % and 1.2 % in Finnish and Dutch populations, respectively.

DPD M166V: The M166V variant is located in a region in exon 6, which is closely situated to the two N-terminal FE-S group. The

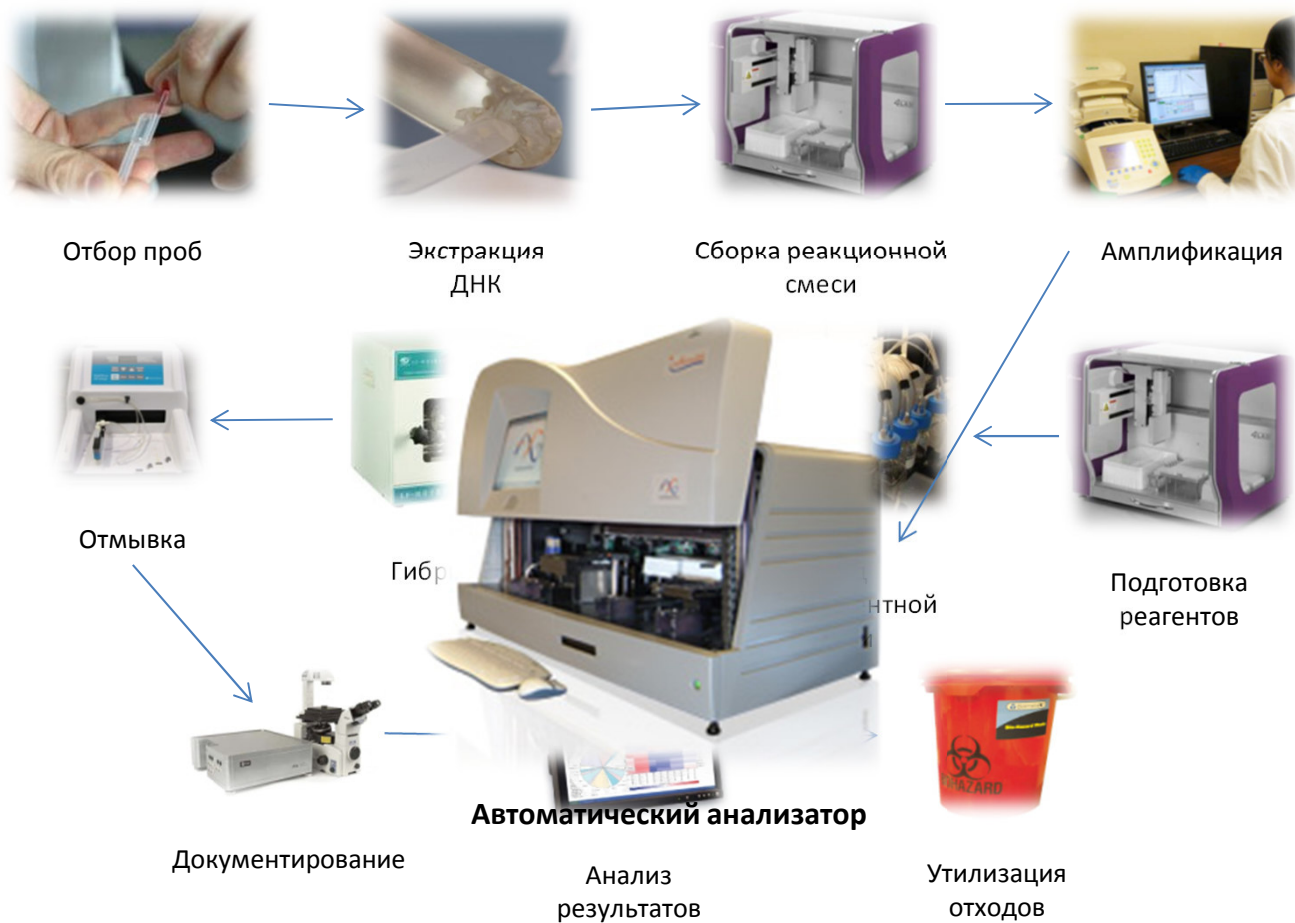
1. Дигидропиримидин дегидрогеназа (DPYD) дезактивирует 5-FU, препарат, применяемый при онкологических заболеваниях.

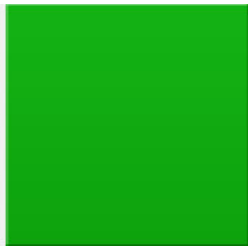
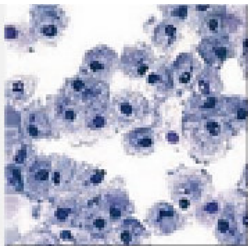
2. Некоторые мутации приводят к снижению активности фермента и увеличивают риск токсических побочных эффектов. Применение стандартных доз 5-FU к пациентам, гомозиготным по полиморфизму *2A, может привести к летальному исходу.

3. FDA не рекомендует прописывать 5-FU пациентам с дефицитом активности DPYD.

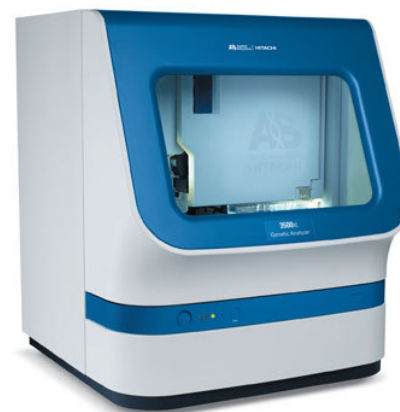


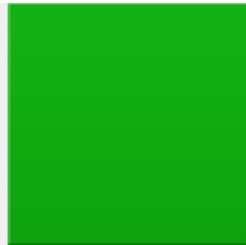
ПЦР – классическая ПЦР – автоматизация





Множество лабораторных протоколов

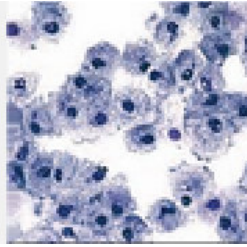




Унификация лабораторных протоколов

-
- Инфекции
- Онкология
- Фармакогенетика
- Наследственные болезни

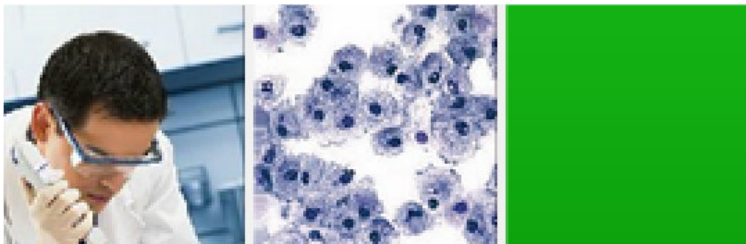
- ВСМ**
БИОХИММАК



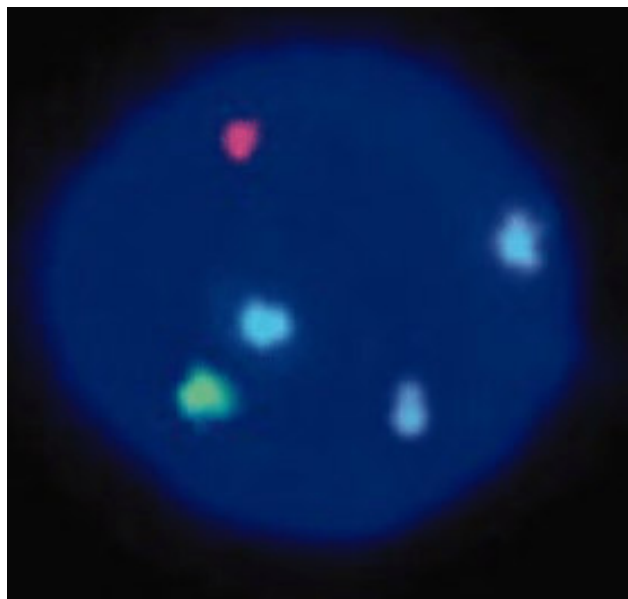
Чипы: преимплантационный скрининг:

- Цель: улучшение результатов ЭКО
- Скрининг всех хромосом на анеуплодии
- Анализируемый материал: начиная от одной клетки
- Время проведения анализа: 12 часов
- Широко используется в мире, уже и в России
- Первый новорожденный в 2008 г. В России – 2013 (Санкт-Петербург)





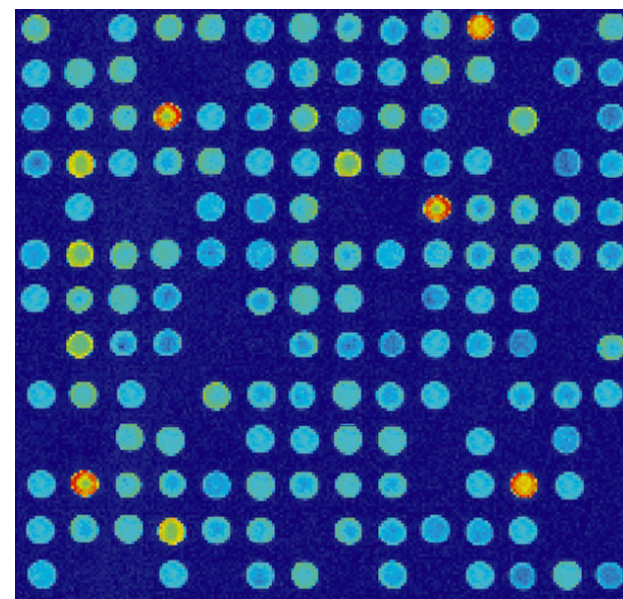
FISH & Чипы



Одновременно 5-9 хромосом

Высокая стоимость анализа (24 хромосомы)

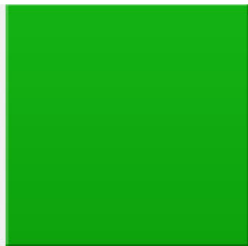
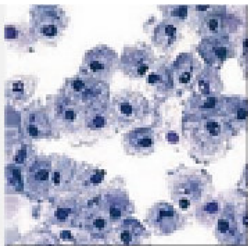
Низкая воспроизводимость между лабораториями



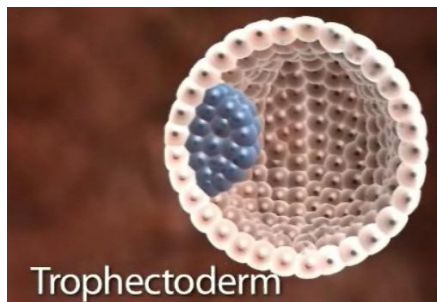
◆ Одновременно 24 хромосомы

◆ Возможность выбора материала для анализа

◆ Высокая воспроизводимость между лабораториями



Чиповые технологии

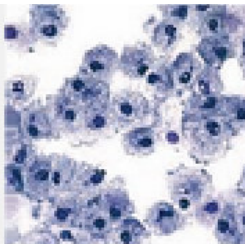


Прободготовка
и полногемная
амплификация
ДНК (3,5 часа)

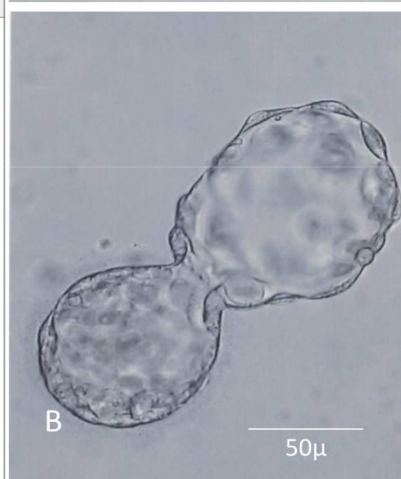
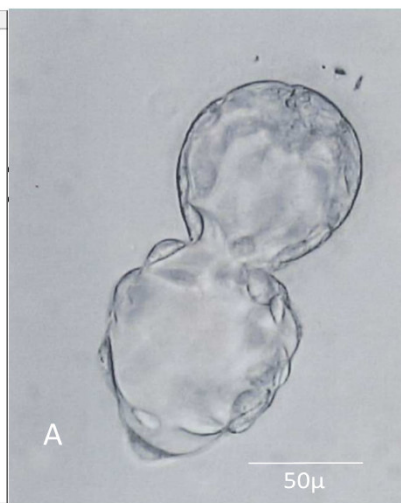
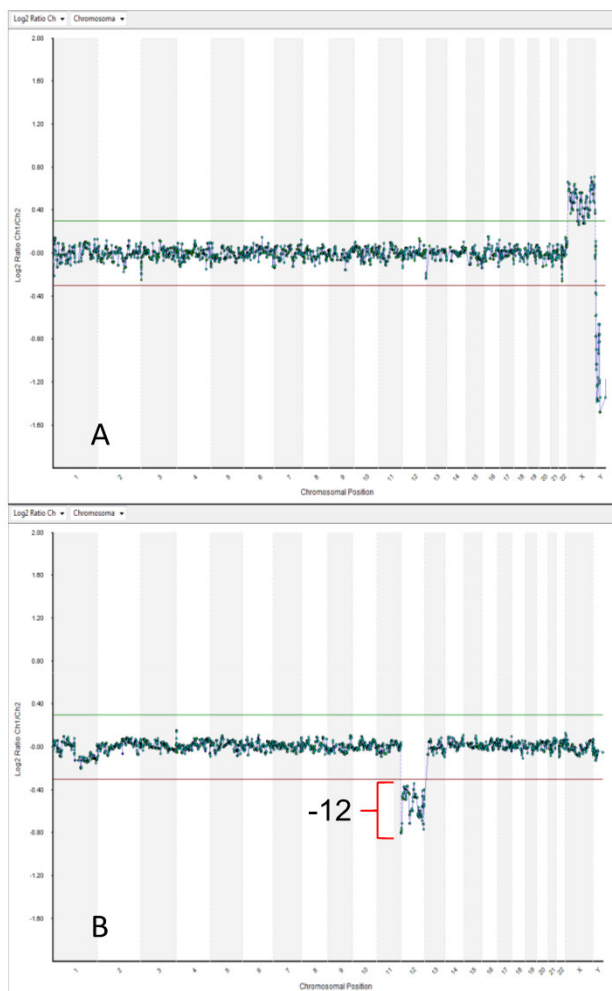
Введение
метки
Cy3, Cy5

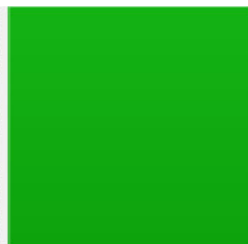
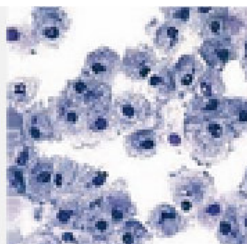
Гибриди-
зация

Сканирование
и
составление
отчета

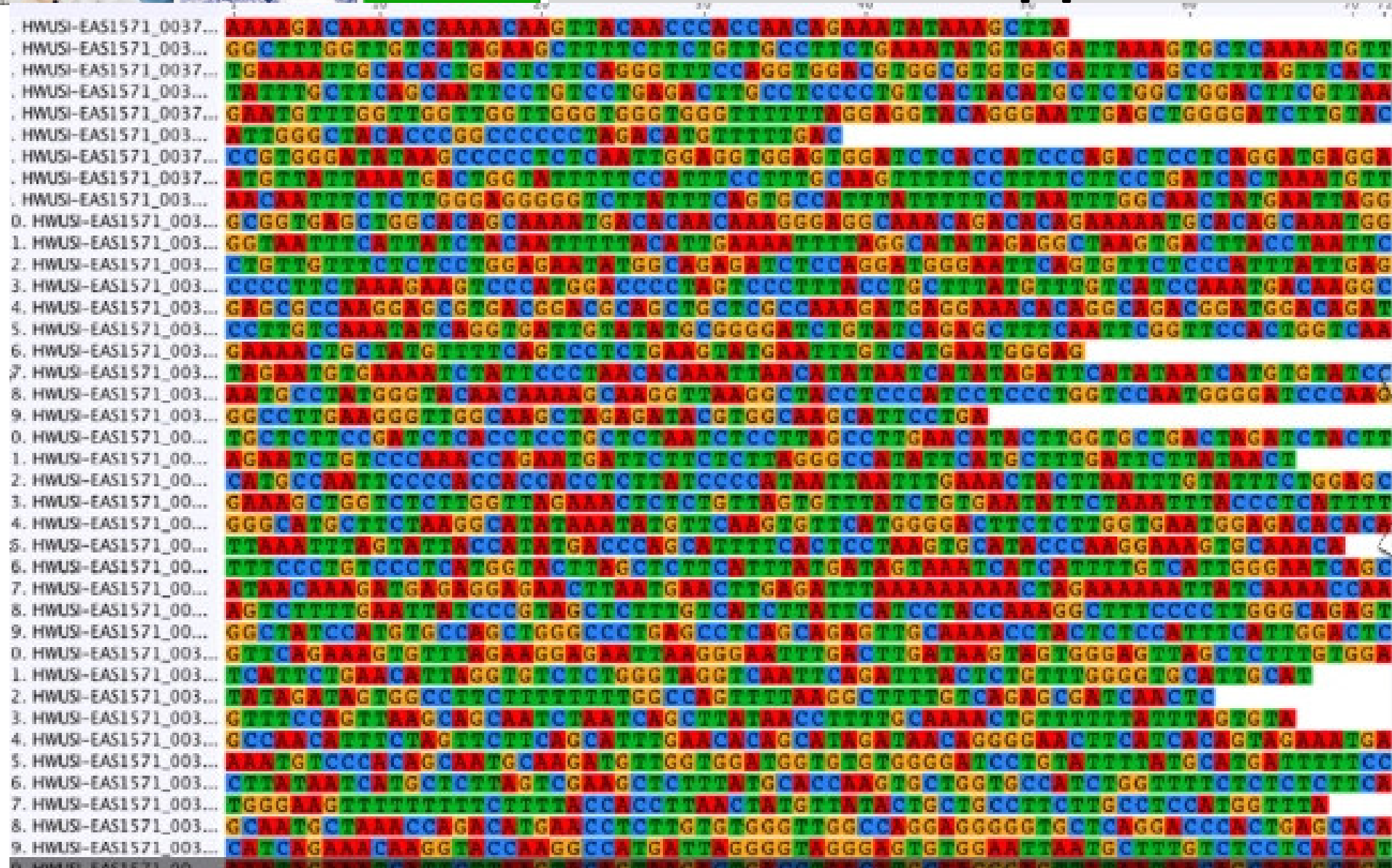


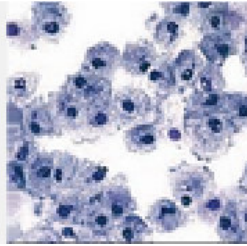
Чиповые технологии RHS





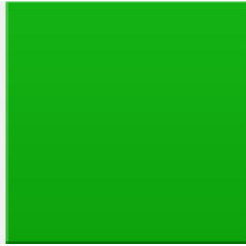
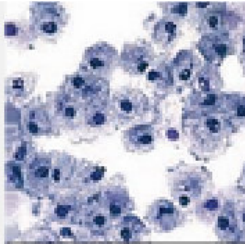
NGS НИПД





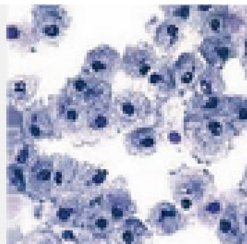
NGS- основные тренды

- Удешевление методики за счет увеличения потока образцов
- Введение НИПД в качестве скрининговой диагностики
- Инвазивная диагностика, как обязательный тест при доказательстве диагноза, выявленного по НИПД



Детали. Риски

- 1. Аппаратное решение. Согласятся ли производители предоставлять свое оборудование и реактивы для производства в России?**
- 2. Нормативная документация. Методические указания. Регистрационные удостоверения- оборудование, реактивы, программное обеспечение**
- 3. Срок проведения анализа.
Поток образцов/Возможности аппаратно-программного комплекса**
- 4. Логистика образцов. Доставка из отдаленных районов страны.**



Детали.

Независимая проверка заявленного уровня точности
НИПД. Апрель 2015

Accurate Description of DNA-Based Noninvasive Prenatal Screening

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

Accurate Description of DNA-Based Noninvasive Prenatal Screening

N Engl J Med 2015; 372:1675-1677 | April 23, 2015 | DOI: 10.1056/NEJMc1412222

To the Editor:

Cell-free DNA-based noninvasive prenatal screening (which has also been called noninvasive prenatal diagnosis and noninvasive prenatal testing) is now offered by several companies that use various analytic methods. This screening has been reported to have higher detection rates for trisomy 21 (Down's syndrome) (99.0%), trisomy 18 (96.8%), and trisomy 13 (92.1%) than previous

TOOLs

- PDF
- Print
- Download Citation
- Supplementary Material
- E-Mail
- Save
- Article Alert
- Reprints
- Permissions
- Share/Bookmark

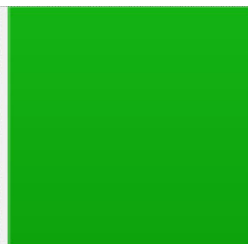
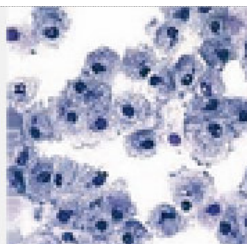
TOPICS

- Obstetrics/ Gynecology >
- Birth Defects >

MORE IN

- Other >
- April 23, 2015 >



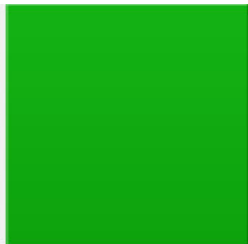
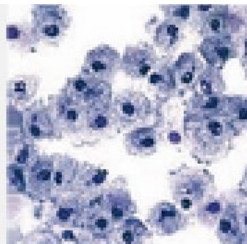


Детали.

Положительные и ложно-положительные результаты

Table 1. True and False Positive Cases with Nonmosaic Karyotypes.

Chromosomal Abnormality	True Positive Result (N=238) <i>no./total no. (%)</i>	False Positive Result (N=56) <i>no./total no. (%)</i>
Trisomy 13	14/26 (54)	12/26 (46)
Trisomy 18	40/52 (77)	12/52 (23)
Trisomy 21	161/177 (91)	16/177 (9)
Monosomy X	8/21 (38)	13/21 (62)
XXX or XXY	15/17 (88)	2/17 (12)
XYY	0/1	1/1 (100)

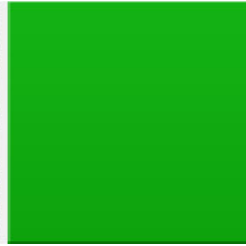
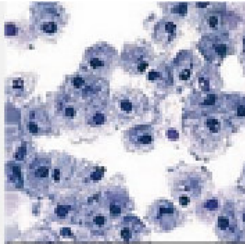


Детали.

Независимая проверка заявленного уровня точности
НИПД. Апрель 2015

Table S1 Age distribution and DNA-based prenatal screening labs

Age distribution		%	False positive	%
<35	79	28%	16	29%
≥35	202	72%	40	71%
unknown	13			
Total	294		56	
Lab (Test Name)		%	True positive	False positive
Sequenom (MaterniT21, SafeT21)	121	44%	98 (81%)	23 (19%)
Ariosa (Harmony)	25	9%	18 (72%)	7 (28%)
Natera (Panorama)	40	14%	32 (80%)	8 (20%)
Illumina (Verifi)	44	16%	35 (80%)	9 (20%)
BGI (NIFTY)	47	17%	41 (87%)	6 (13%)
Integrated Genetics (Informaseq)	1	<1%	0	1 (100%)
Total	278	95%	224	54
unknown	16	5%		
Total	294			



Детали.

Основные проблемы

- “Работа с частными клиниками. Назначают по показаниям или из-за экономической заинтересованности врача/клиники?”
- Работа с государственными центрами проходит через индивидуальных врачей. Обратная связь?
- Что будет в случае ошибки??? Ложно отрицательной ошибки! Кто несет ответственность в случае ошибки? Каков правовой статус теста?
- Этическая проблема в случае определения пола плода до 12 недели”

Прохорчук Е.Б. VII съезд Российского общества медицинских генетиков.
Всероссийская научно-практическая конференция Пренатальная диагностика наследственных и врожденных заболеваний: настоящее и будущее

ВСМ
БИОХИММАК

www.biochemmack.ru
info@biochemmack.ru

