

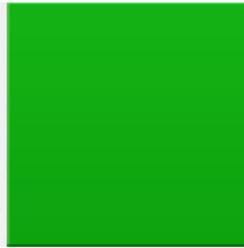
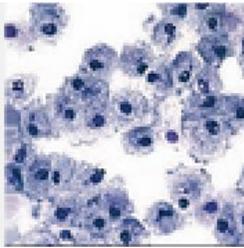
# Использование чиповых технологий в молекулярной онко и инфекционной диагностике.

Филатова Людмила

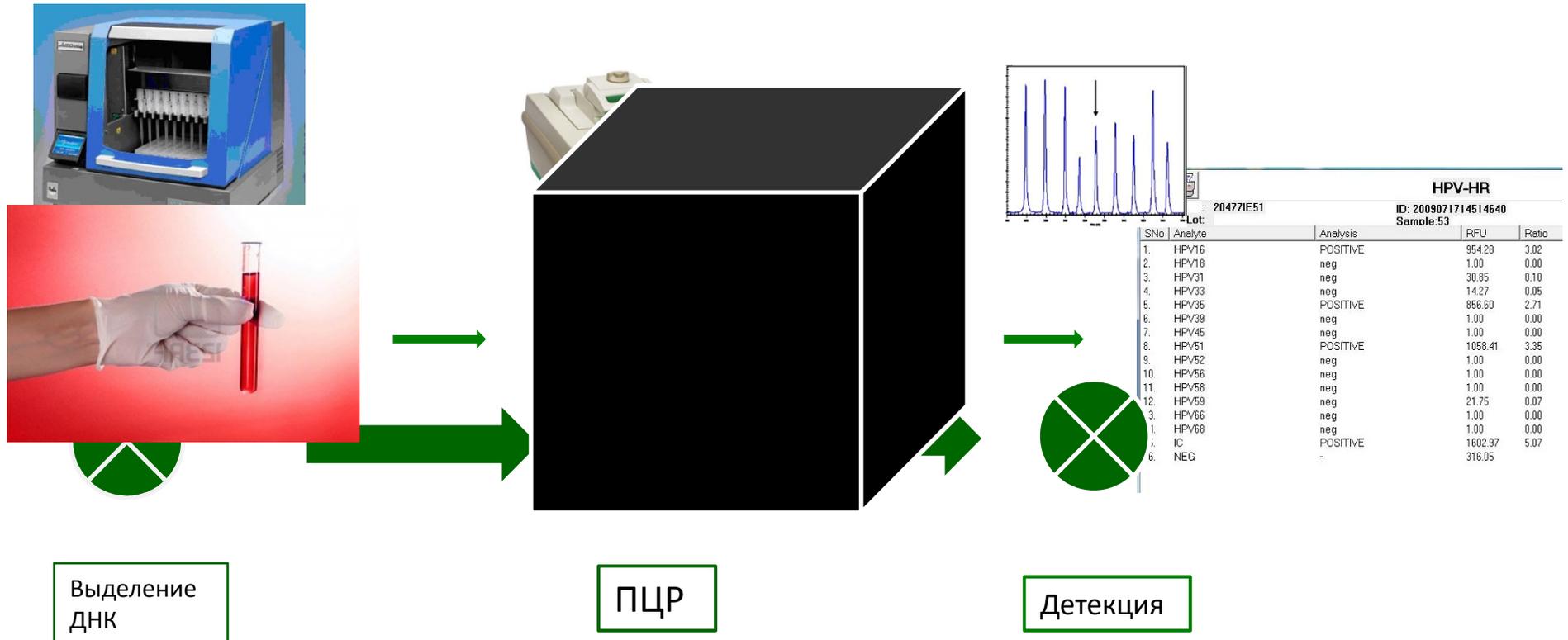
К.б.н.

Волгоград, 23.10.2014

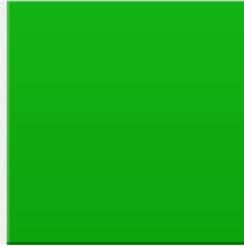
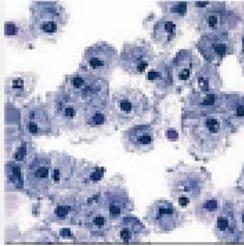
**ВСМ**  
БИОХИММАК



# Процедура анализа в молекулярной диагностике







# Онкология

- Онкология

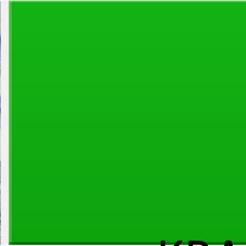
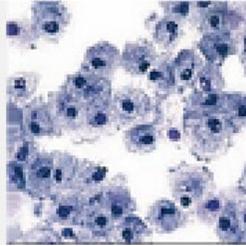
- Статистика смертности ВОЗ

- рак легких - 1,37 млн
    - рак желудка – 736 тыс.
    - рак печени – 695 тыс.
    - рак толстого кишечника – 608 тыс.
    - рак молочной железы – 458 тыс.
    - рак шейки матки – 275 тыс.

- Тест-наборы INFINITY

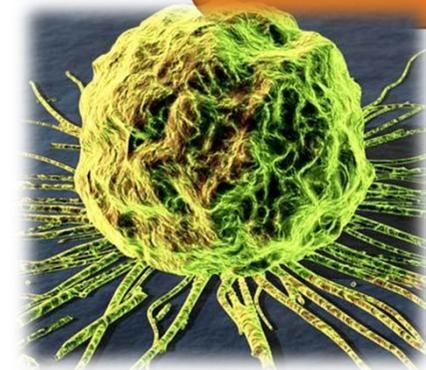
- **EGFR INFINITY:** 49 мутаций для правильного применения Gefитиниба и Эрлотиниба (рак легких)
    - **KRAS-BRAF INFINITY:** 23 мутации в KRAS и BRAF онкогенах (рак толстого кишечника, анти-EGFR терапия)
    - **5-FU INFINITY:** 8 мутаций, влияющих на риск применения 5-Фторурацила (рак толстого кишечника, рак молочной железы, миеломы)
    - **UGT1A1 INFINITY:** полиморфизм \*1, \*28, \*36, \*37 (применение Иринотекана)





# Онкология

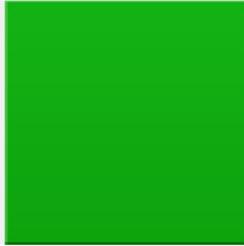
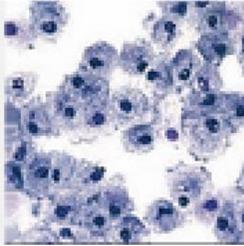
- Мутации в онкогенах KRAS-BRAF.
  - ~ 45% пациентов с колоректальным раком имеют мутации в онкогене (KRAS)
  - ~ 12% пациентов с колоректальным раком имеет мутации в онкогене (BRAF)
- Ассоциированные типы рака:
  - Колоректальный (преимущественно)
  - Рак поджелудочной железы
  - Рак легкого
  - Рак желчного пузыря
  - Рак щитовидной железы
- Выявление мутаций KRAS & BRAF указывает, что антити-EGFR терапия не будет работать у этих пациентов





## KRAS-BRAF

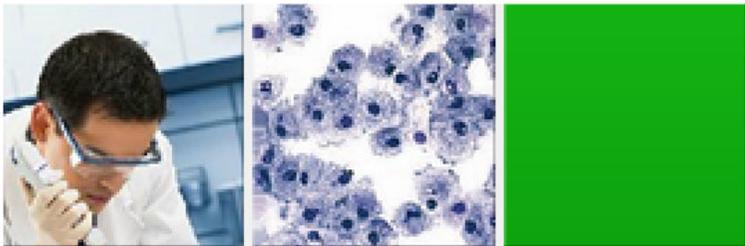
Intell.Lot: 20484B13N		SampleID: 26DEppendorf		Oct 21, 2014	
Magz.Lot: 02011520806F29N		RunID: 100273		14:34	
SNo	Analyte	Analysis	RFU	Ratio	
	<b>KRAS</b>				
1	G12		9191.00	0.00	
2	G12A	Neg	125.00	0.00	
3	G12C	Neg	155.50	0.00	
4	G12D	Neg	166.50	0.00	
5	G12F	Neg	146.00	0.00	
6	G12R	Neg	138.00	0.00	
7	G12S	Neg	156.00	0.00	
8	G12V	Neg	118.00	0.00	
9	G13		3263.50	0.00	
10	G13A	Neg	191.00	0.00	
11	G13C	Neg	85.50	0.00	
12	G13D	Positive	34066.00	0.70	
13	G13R	Neg	128.50	0.00	
14	G13S	Neg	310.50	0.01	
15	G13V	Neg	181.00	0.00	
16	Amplicon1		48422.00	0.00	
17	Q61		18000.00	0.00	
18	Q61E	Neg	86.00	0.00	
19	Q61H1	Neg	107.00	0.01	
20	Q61H2	Neg	111.50	0.01	
21	Q61K	Neg	122.00	0.01	
22	Q61L	Neg	139.00	0.01	
23	Q61P	Neg	172.50	0.01	
24	Q61R	Neg	702.00	0.04	
25	Amplicon2		19440.00	0.00	
	<b>BRAF</b>				
26	V600		31884.00	0.00	
27	V600A	Neg	136.50	0.00	
28	V600D	Neg	372.50	0.01	
29	V600E1	Neg	47.50	0.00	
30	V600E2	Neg	256.50	0.01	
31	V600KRM	Neg	206.00	0.01	
32	Amplicon3		32903.00	0.00	
33	HYBC		1000.00	0.00	
34	BKGD		619.50	0.00	



# Онкология-5 FU

- Более чем 2 млн. пациентов с РМЖ, РПК, раком кожи и т.д. получают терапию 5-Fu
- Несмотря на появление все более новых биологически активных препаратов для лечения РПК, 5-Fu остается основным лекарственным средством, несмотря на высокий риск побочных эффектов
- Генетические вариации в 3 различных генов, как было показано, влияют на эффективность дозировки 5-Fu





# Миниатюризация

## Система MutaCHIP - мультиплексный анализ на макрочипах



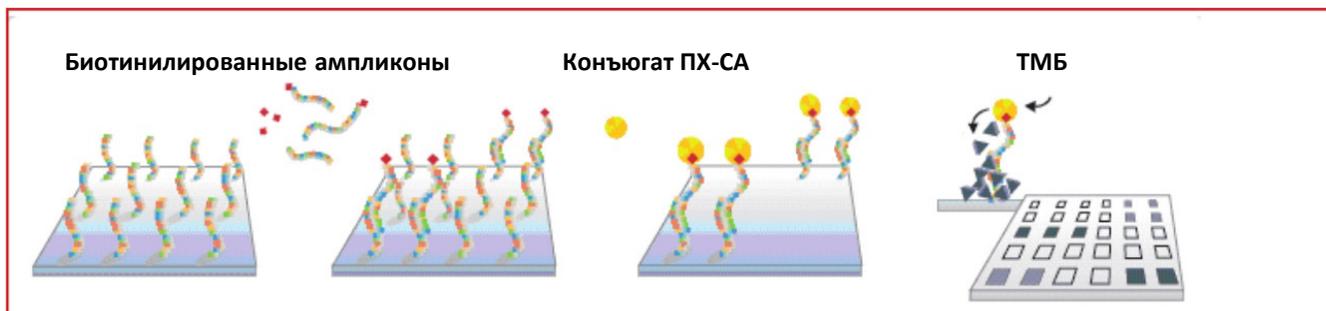
1. ПЦР (~1.5 часа)

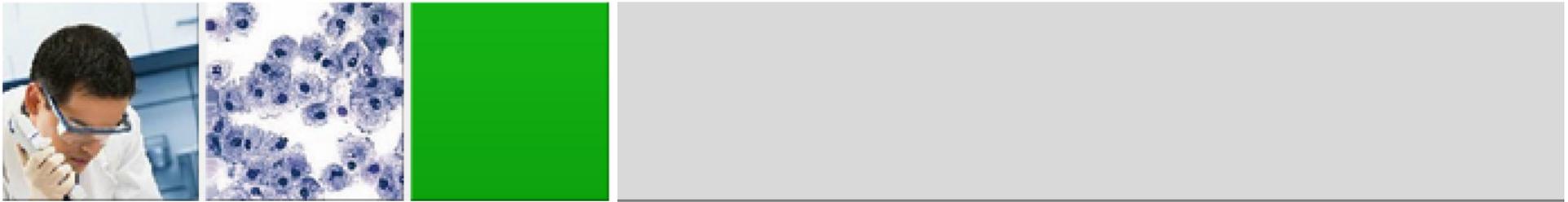


2. Гибридизация (2 часа)



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

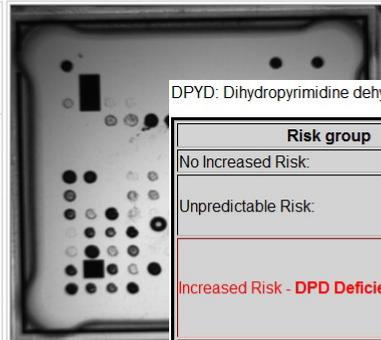




**DPYD Genotyping**

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).
<b>Important! The final therapeutic decision is always on behalf of the attending physician.</b>	

**Notes:**

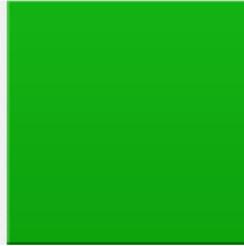
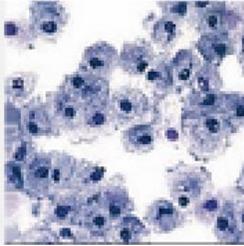
**DPYD\*2A:** This mutation is by far the most relevant variant (1). A correlation between genotype and phenotype is very well described and shown in various studies. The \*2A allele represents a G to A mutation in the GT'5 splicing recognition sequence of intron 14, which results in a 165-bp deletion (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.

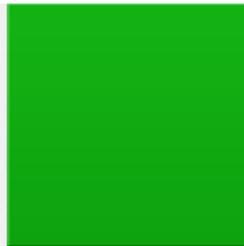
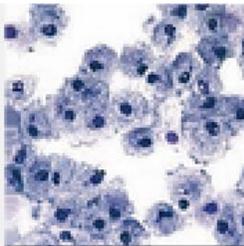
2. Некоторые мутации приводят к снижению активности фермента и увеличивают риск токсических побочных эффектов. Применение стандартных доз 5-FU к пациентам, гомозиготным по полиморфизму \*2A, может привести к летальному исходу.

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



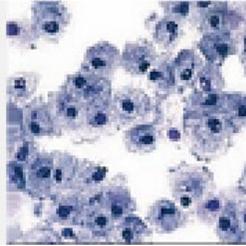
# ПЦР – классическая ПЦР – автоматизация





# Множество лабораторных протоколов

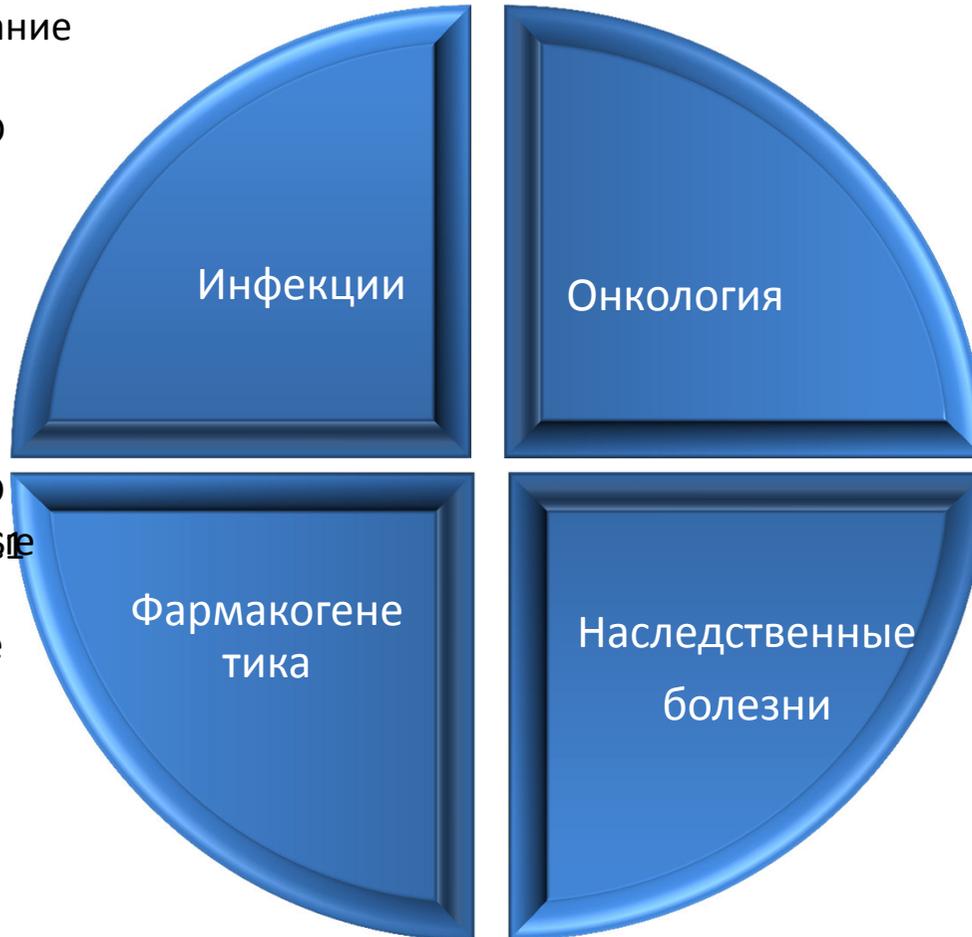




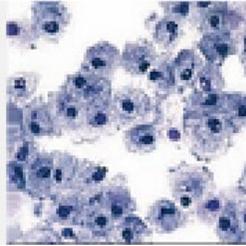
# Унификация лабораторных протоколов

- Генотипирование HPV
- HPV-HR QUAD
- HPV-HR
- HPV-HR HEX
- HPV QUAD
- STD-6 QUAD
- CT-NG QUAD
- Leuko QUAD

- Warfarin Gen QUAD
- CYP4B1
- CYP2C19
- CYP4V2
- CYP4V2
- CYP4V2
- CYP4V2
- CYP4V2
- CYP4V2
- MDR1
- ELU-A-sH1N1

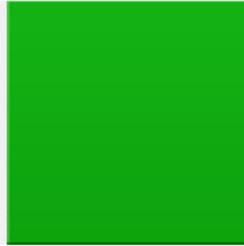
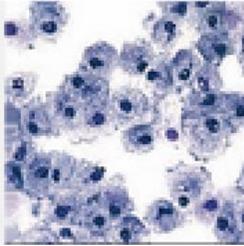


- KRAS-BRAF
- KRAS
- BRAF
- BRAF-XP
- 5-FU
- UGT1A1
- F II-V
- F II-V&MTHFR
- F II Plus-V
- F II Plus-V&MTHFR
- Генотипирование F V
- CFTR-31
- ApoE
- FVF Panel
- Ashkenazi Jewish Panel



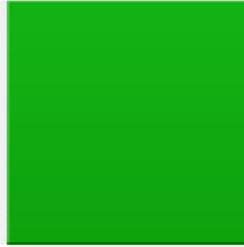
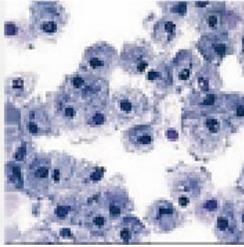
# Унификация лабораторных протоколов

<b>INFINITI® HPV Генотипирование, 26 типов</b>	<b>ВКР:</b> 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58, 59, 66, 68
<b>INFINITI® RVP Pus, 25 видов</b>	<b>Вирусы группа:</b> А, «свиной» H1N1, В <b>Вирусы парагруппа (HPIV):</b> 1, 2, 3, 4
<b>INFINITI® MDR-TB, для детекции мутаций <i>M. tuberculosis</i> и <i>M. bovis</i></b>	<b>POSмыс (MTB ID)</b> <b>дикий тип <i>ropB</i>:</b> 511-S, 516-S, 526-S, 531-
<b>INFINITI® Candida Vaginitis QUAD (1 чип на 4 пациентов), 5 возбудителей кандидозных вагинитов</b>	<i>C. albicans, C. krusei, C. tropicalis, C. glabrata, C. parapsilosis</i>
	<i>Trichomonas vaginalis</i>
<b>INFINITI® Bacterial Vaginosis QUAD (1 чип на 4 пациентов), 6 возбудителей бактериальных вагинозов</b>	<i>Bacteroides fragilis, Mobiluncus mulieris, Atopobium vaginae, Gardnerella vaginalis, Mobiluncus curtisii, Prevotella bivia</i>
	<b>мутанты по <i>rpsA</i>, устойчивость к пиразинамиду:</b> H57D, T100P



# Унификация лабораторных протоколов

<b>INFINITI® KRAS-BRAF, 23 полиморфизма</b>	<b>KRAS Codon 12:</b> G12A, G12C, G12D, G12F, G12R, G12S, G12V
<b>INFINITI® 5-FU, 8 полиморфизмов</b>	<b>DPYD:</b> 85T>C, IVS14+1 G>A, 1590T>C, 1679T>G, and 2846A>T <b>MTHFR:</b> 677C>T, 1298A>C <b>TYMS:</b> ins/del TTAAAG в 3'-нетранслируемом регионе



## Женское здоровье - вирус папилломы человека

- Папилломавирусы

- ВПЧ высокого канцерогенного риска

- 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68

- Тип 16 и 18 встречаются в 70% случаев

- Вызывают рак шейки матки

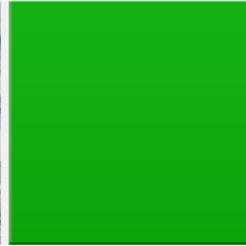
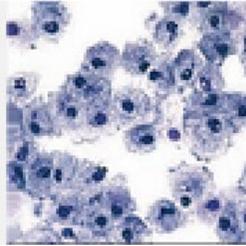
- Второй по распространенности рак у женщин после рака груди

- 275 тысяч случаев смерти в год в мире

- Вакцина Гардасил одобрена к применению в США, зарегистрирована в России. Защищает от ВПЧ 6, 11, 16 и 18

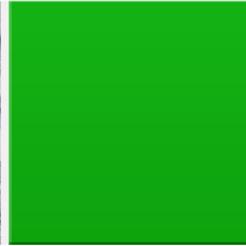
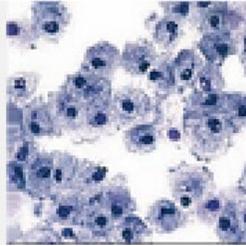
- **ВПЧ INFINITY** детектирует 5-10 копий вируса и генотипирует 26 типов в одном образце.





## Женское здоровье - вирус папилломы человека

- Генотипирование ВПЧ – более высокая чувствительность по сравнению со скринингом
- Определение каждого типа ВПЧ, а не всей группы
- Возможность выявления персистирующей инфекции и вновь приобретенной

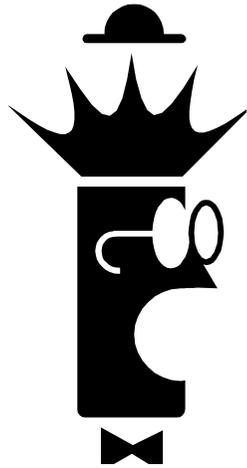


# Женское здоровье - вирус папилломы человека

Аналитическая чувствительность

чипов

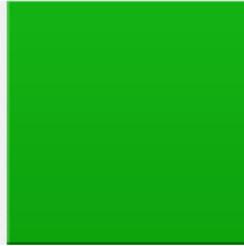
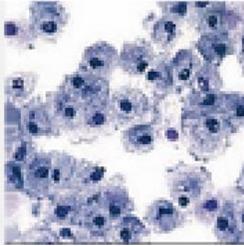
5-10 копий



Аналитическая чувствительность

ПЦР

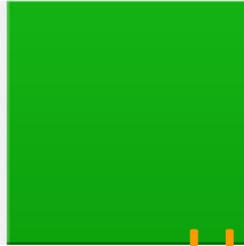
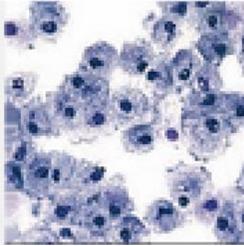
$1 \times 10^3$  копий



## Женское здоровье - вирус папилломы человека

### Детектируемые типы ВПЧ

- Высокого/среднего канцерогенного риска: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 67, 68, 69, 73, 82
- Низкого канцерогенного риска:  
6, 11, 30, 34, 70, 85

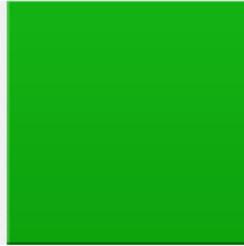
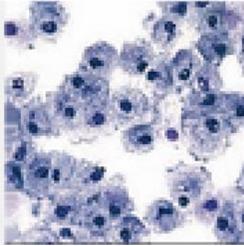


# Вариант отчёта

## HPV-HR QUAD

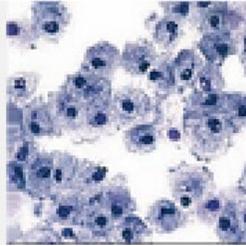
		HPV-HR			
Intell.Lot : 20477IE51		ID: 2009071714514640			
BFCmaq.Lot:		Sample:53			
SNo	Analyte	Analysis	RFU	Ratio	
1.	HPV16	POSITIVE	954.28	3.02	
2.	HPV18	neg	1.00	0.00	
3.	HPV31	neg	30.85	0.10	
4.	HPV33	neg	14.27	0.05	
5.	HPV35	POSITIVE	856.60	2.71	
6.	HPV39	neg	1.00	0.00	
7.	HPV45	neg	1.00	0.00	
8.	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	
13.	HPV66	neg	1.00	0.00	
14.	HPV68	neg	1.00	0.00	
15.	IC	POSITIVE	1602.97	5.07	
16.	NEG	-	316.05		

Один анализ – два результата: скрининг и типирование  
СКРИНОТИПИРОВАНИЕ



# Преимущества наборов INFINITI HPV-HR

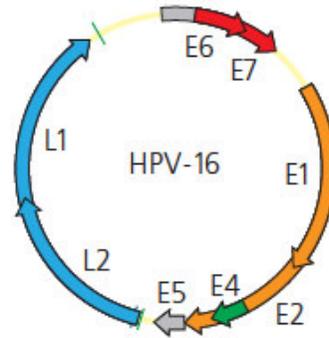
- Идентификация вирусов разных типов может помочь в оценке персистирования инфекции
- Возможность мониторинга инфекции, вызванной специфическим типом вируса
- Любой HPV ВКР тип представляет угрозу, если не достигнута эрадикация
- Выявление реального персистирования позволяет врачу сосредоточить внимание на пациентах с высоким риском канцерогенеза
- Анализ локуса E1 вирусного генома повышает достоверность результатов
- Использование метода двойной «амплификации» TSA (T – “target”, S – “signal”, A – “amplification”) существенно повышает чувствительность детекции (предел детектирования - 5-100 копий против обычных 1000 и более)



# Преимущества наборов INFINITI HPV-HR

## Вирусный геном

**Поздние гены, кодирующие**  
L1 – основной белок оболочки  
L2 – минорный капсидный белок



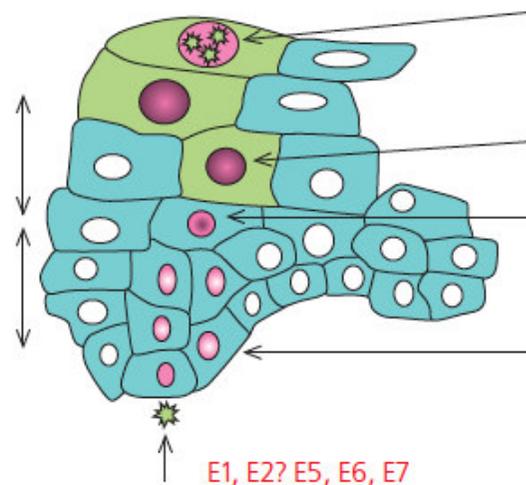
**Ранние гены, отвечающие за**

- E1 – репликацию
- E2 – репликацию и транскрипцию
- E4 – высвобождение вирусов
- E5 – противодействие иммунитету
- E6/ E7 – связывание p53/pRB, реактивацию синтеза ДНК в неделящихся клетках, задержку дифференциации и злокачественное перерождение

Сборка вирусных частиц

Клеточная дифференциация, экспрессия вирусных генов E и L

Деление клеток. Экспрессируются только гены E, очень низкий уровень белкового синтеза



Вирус инфицирует базальную стволовую клетку

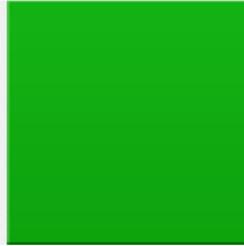
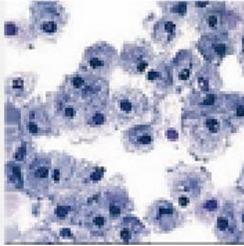
Клетки, готовые к десквамации  
L1, L2

До 1000 копий вирусного генома на клетку  
E6, E7, E1, E2, E5, L1, L2, E4

Амплификация вирусной ДНК в неделящихся клетках

Одновременное деление клеток и репликация вируса  
E1, E2

6 недель



## Женское здоровье - ЗППП

- ЗППП-6

- 6 наиболее распространенных инфекций

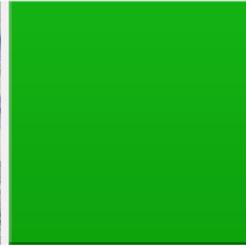
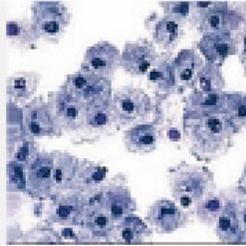
- Chlamydia trachomatis
- Neisseria gonorrhoea
- Trichomonas vaginalis
- Mycoplasma genitalium
- Mycoplasma hominis
- Ureaplasma urealyticum

- Статистика ВОЗ: 1 миллион человек инфицируется в день

- Статистика России: 40-50 заболеваний на 100 000 населения

- **ЗППП-6 INFINITY** детектирует все 6 микроорганизмов.





## Женское здоровье - ЗППП

**Выявление**

*Chlamydia trachomatis*  
*Neisseria gonorrhoea*  
*Trichomonas vaginalis*  
*Mycoplasma genitalium*  
*Mycoplasma hominis*  
*Ureaplasma urealyticum*

**Материал:**

Эндоцервикальные соскобы

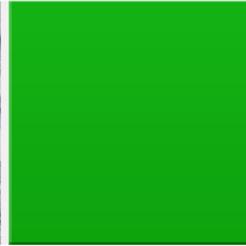
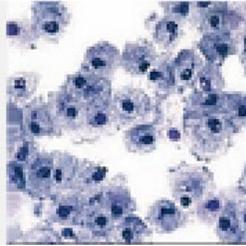
**Формат**

Мультиплексная ПЦР

**Производительность**

16 образцов(пациентов) за 4 часа

24 образца за 5 часов .



## Женское здоровье - БВ

**Выявление:**

*B. fragilis*  
*M. mulieris*  
*A. vaginae*  
*G. vaginalis*  
*M. curtisii*  
*P. bivia*

**Материал:**

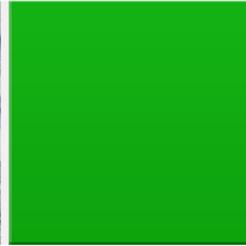
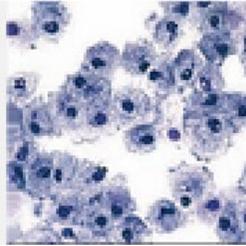
Соскобы  
Моча

**Формат:**

Мультиплексная ПЦР

**Производительность**

16 образцов за 4 часа.  
24 образца за 5 часов.



# Женское здоровье - Кандидозы

**Выявление:**

*C. albicans*  
*C. krusei*  
*C. tropicalis*  
*C. glabrata*  
*C. parapsilosis*

**Материал:**

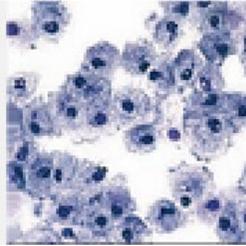
Соскобы  
Моча

**Формат:**

Мультиплексная ПЦР

**Производительность**

16 образцов за 4 часа.  
24 образца за 5 часов.



# Инфекционные заболевания



## – Туберкулез

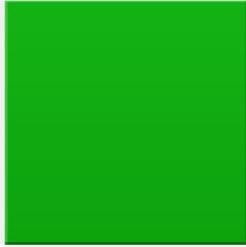
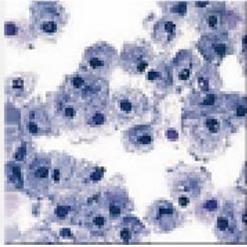
- Второе по смертности инфекционное заболевание (1,4 млн)
- ТБ с множественной лекарственной устойчивостью

**MDR-TB** (МЛУ-ТБ, 50 млн человек в мире) **RVP Plus** (25 респираторных вирусов):

## – Респираторные вирусные инфекции

- Микобактериальный туберкулезный комплекс
- 1 из 3 человек подвержен РВИ в год
- Устойчивость к Ифампицину, Изониазиду и Пиразинамиду
- 100 копий бактерии, 6 часов
- Influenza A/Swine H1N1 and B
- Human Parainfluenza Virus (HPIV) 1, 2, 3, 4
- Rhinovirus A and B
- Enterovirus A, B, C, D
- Coronavirus HKU1, OC43, NL63, 229E
- Human Metapneumovirus (HMPV) A, B
- Human Respiratory Syncytial (HRSV) A and B
- Adenovirus A, B, C, E

- **NTM** (не-ТБ микобактерии)
  - 11 микроорганизмов



## Инфекционная панель- туберкулез

**Выявление:**

Туберкулезный  
комплекс

Резистентность к  
антибиотикам

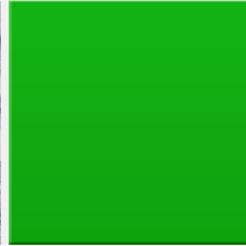
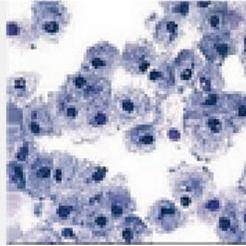


**Образцы:**

Клеточный лизат

**Формат:**

Мультиплексная ПЦР



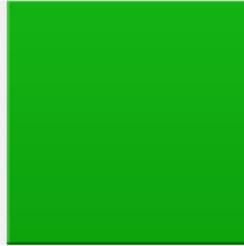
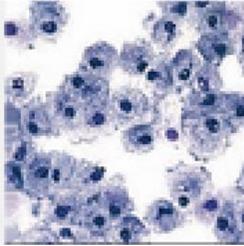
## Инфекционная панель-не туберкулезные микобактерии

1) случайное загрязнение материала нетуберкулезными микобактериями из окружающей среды;



**(2)** носительство нетуберкулезных микобактерий, которые могут заселять (колонизировать) отдельные органы и системы человека (респираторный, желудочно-кишечный тракт, мочевыделительные пути)

**(3)** заболевание микобактериозом.



# Инфекционная панель-не туберкулезные микобактерии

**Выявление:**

*M. avium complex*  
*M. kansasii*  
*M. chelonae*  
*M. abscessus / M. mucogenicum*  
*M. marinum/M. ulcerans*  
*M. haemophilum*  
*M. xenopi*  
*M. gordonae*  
*M. scrofulaceum*  
*M. fortuitum*  
*M. smegmatis.*

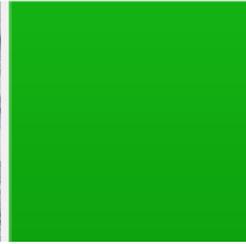
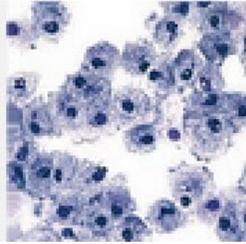


**Образцы:**

Клеточный лизат

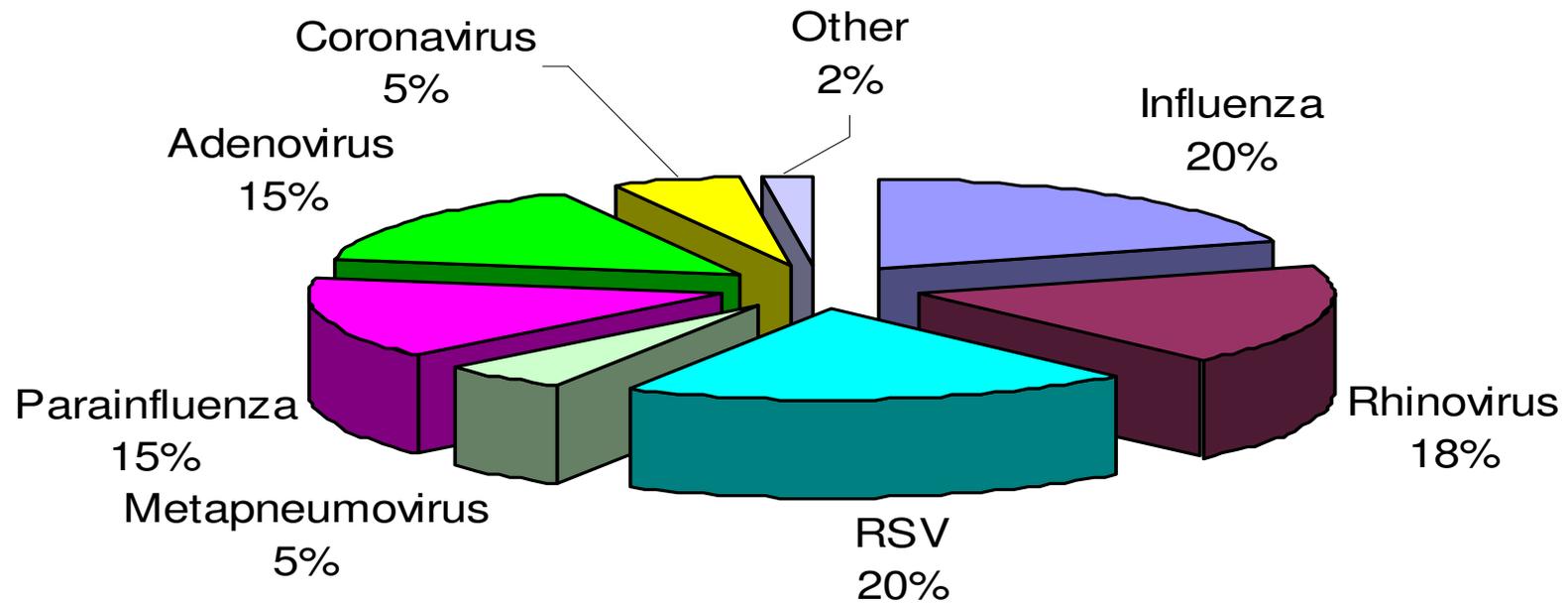
**Формат:**

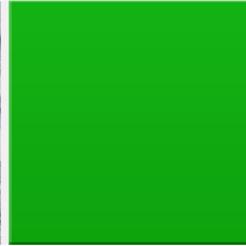
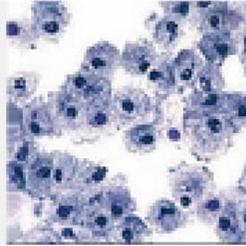
Мультиплексная ПЦР



# Инфекционная респираторная панель

## Estimated Viral Incidence Distribution





# Инфекционная респираторная панель

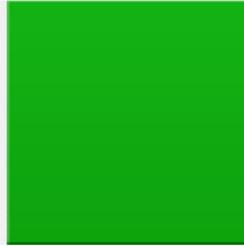
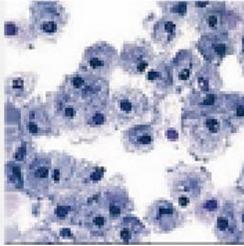
## Выявление:

Influenza A/Swine H1N1 and B  
Human Parainfluenza Virus (HPIV) 1, 2, 3, 4  
Rhinovirus A and B  
Enterovirus A, B, C, D  
Coronavirus HKU1, OC43, NL63, 229E  
Human Metapneumovirus (HMPV) A, B  
Human Respiratory Syncytial (HRSV) A and B  
Adenovirus A, B, C, E



## Образцы:

PHK



# Фармакогенетика

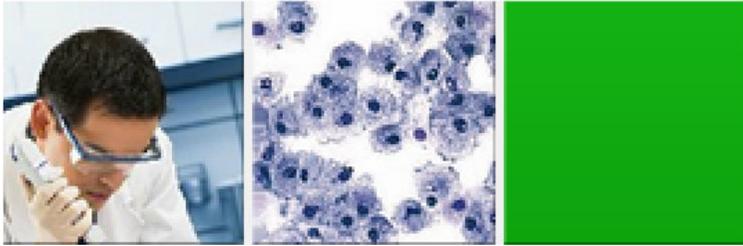


## – Метаболизм лекарств

- определяется генотипом пациента
- быстро метаболизирующий – низкая эффективность
- медленно метаболизирующий – токсичность
- средний – ожидаемый эффект препарата

## – Тест-наборы INFINITY

- **CYP450 INFINITY:** полиморфизм генов цитохрома P450
- Подбор дозы антидепрессантов
- Подбор дозы антикоагулянтов (Плавикс/Варфарин, Прасугрел)
- Подбор дозы онкологических препаратов (Тамоксифен)
- Подбор дозы болеутоляющих препаратов (Кодеин, Викодин)



## Заключение

*автоматизация, мультиплексность  
миниатюризация*

### 1. Полная автоматизация

- Минимальное вмешательство оператора в аналитический процесс
- Стандартизованная процедура анализа



### 2. Мультиплекс

- Повышение специфичности, чувствительности и достоверности
- Увеличение пропускной способности

### 3. Миниатюризация

- Чипы для различных видов диагностики, постоянное расширение панели.



- Возможность использовать минимальное кол-во материала

### 4. Снижение себестоимости



