

Новые возможности ПЦР-диагностики в реальном времени

Ведущий специалист
ООО «ДНК-Технология»
к.б.н. Зорина В.В.
2014г.

Востребованность ПЦР-исследований

❖ *Медицина, система санитарно-эпидемиологического контроля*

- *диагностика инфекций:*
 - особо опасные и социально значимые инфекции;
 - эпидемические инфекции;
 - гемотрансмиссивные инфекции;
 - оппортунистические инфекции;
 - TORCH-инфекции;
 - исследование биоценозов;
- *диагностика иммунных патологий*
- *генетические исследования наследственных заболеваний*
- *определение ГМИ пищевых продуктов*

❖ *Ветеринария и растениеводство*

- *инфекционные заболевания*
- *определение видовой принадлежности*

❖ *Наука*

- *генная инженерия, микробиология, генетика и др.*

❖ *Промышленность*

- *определение биологического загрязнения (санитарный контроль)*

❖ *Судебная медицина*

- *идентификация личности*

Особенности метода ПЦР

❖ **Метод эффективен относительно ИФА:**

- в период «серологического окна» и ситуации «иммунологического следа»
- при иммунологической толерантности
- при генетически обусловленной серонегативности

❖ **Преимущества относительно микроскопии:**

- низкий уровень субъективности (при световой микроскопии выявляют не более 10 морфотипов)
- возможность выявления возбудителя в низкокопийном образце (при микроскопии мазков можно выявить микроорганизмы, присутствующие в биоматериале в количестве, превышающем 10^5 КОЕ/мл)
- выявление L-форм

Чувствительность микроскопии в диагностике (по данным Савичевой А.М.):

T.vaginalis - 30% (для женщин – 50-60%, для мужчин – 10-12%)

N.gonorrhoeae у мужчин - 80-95%, у женщин - 30-50%

C.trachomatis – 10-12%

Зарегистрированные наборы реагентов для ПЦР-диагностики должны обладать чувствительностью не менее 98%

Относительно культурального метода:

- возможность выявления длительно и трудно культивируемых микроорганизмов (например, многие анаэробы, *M.tuberculosis*) и некультивируемых микроорганизмов.
- возможность одномоментного выявления широкого спектра микроорганизмов, с разными сроками культивирования (возможность исследования сложных систем, например, биоценозы)
- не зависит от жизнеспособности микроорганизмов

Возможности метода ПЦР

- ❖ **Качественный и количественный анализ** (определение вирусной и бактериальной нагрузки) – индивидуальный подход к терапии и оценка ее эффективности
- ❖ **Определение ДНК и РНК** (возможность оценки транскрипционных профилей и экспрессии генов; выявление РНК-содержащих вирусов)
- ❖ **Мультиплексный анализ** (выявление нескольких мишеней в одной пробирке) – сокращение сроков исследования
- ❖ **Выявление SNP** (однонуклеотидные замены в последовательности ДНК) – диагностика и/или выявление рисков развития мультифакторных заболеваний
- ❖ **Контроль взятия материала** (контроль преаналитического этапа)

Перспективные направления ПЦР-исследований

Репродуктивная медицина

❖ Исследование биоценоза урогенитального тракта:

- количественный анализ комплекса аэробных и анаэробных микроорганизмов, микоплазм, грибов рода *Candida*, участвующих в развитии дисбиотических процессов в урогенитальном микробиоценозе
- определение этиологии инфекционного процесса (*аэробный, анаэробный, смешанный дисбиоз*)
- дифференцированный анализ степени выраженности дисбиотических нарушений
- возможность определения объема назначаемой терапии, индивидуальный подбор схемы лечения

❖ Генотипирование HLA II класса:

- риск аутоиммунных патологий
- определение антигенов тканевой совместимости у супругов

❖ Делеции AZF-локуса – генетически обусловленное нарушение сперматогенеза:

- прогноз возможности получения сперматозоидов для ВРТ
- прогноз для потомства мужского пола возможности наследования репродуктивных проблем отца
- предимплантационная диагностика для исключения наследования репродуктивных проблем отца

❖ КардиоГенетика Тромбофилия – полиморфизмы генов системы гемостаза:

- риск реализации генетически обусловленных тромбофилий на фоне ОКО, ГЗТ, беременности
- отягощенный акушерско-гинекологический анамнез (привычное невынашивание, ВЗРП, эклампсия, фетоплацентарная недостаточность, хроническая гипоксия плода)

❖ Генетика метаболизма фолатов – полиморфизмы генов фолатного цикла:

- привычное невынашивание беременности
- рождение ребенка с изолированными пороками нервной трубки, сердца или урогенитального тракта
- тромбоэмболии, антифосфолипидный синдром

Нормативная база

- ❖ **Приказ Минздрава России от 20.12.2012 N 1273Н «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи при привычном невынашивании беременности»**
- ❖ **Стандарт от 5 февраля 2013 г. «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи при привычном невынашивании беременности»**
- ❖ **Приказ Минздрава России от 07.11.2012 N 588н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при гипоксии плода, недостаточном росте плода, других плацентарных нарушениях»**
- ❖ **МЗ РФ ПИСЬМО 27 ноября 2002 г. N 2510/11891-02-32 «Профилактика тромбоэмболии легочной артерии в акушерской практике»**
- ❖ **МЗ РФ ПРИКАЗ от 21 февраля 2000 г. N 64 «Об утверждении номенклатуры клинических лабораторных исследований»**
- ❖ **Национальные медицинские критерии приемлемости методов контрацепции, 2012г**
- ❖ **Клинические рекомендации «Тромбозы у детей» - Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д.Рогачева, 2012 г**
- ❖ **Лечение неонатальных тромбозов. Проект протокола, 2013г**
- ❖ **Тромбофилии в акушерской практике. Методические рекомендации НИИ акушерства и гинекологии имени Д.О. Отта СЗО РАМН, 2010г**

Перспективные направления ПЦР-исследований Онкогенетика. *BRCA*-ассоциированный рак молочной железы

У женщин с наличием мутации гена *BRCA1*:

- риск развития рака РМЖ на протяжении жизни - **50-80%**
- риск развития рака во второй молочной железе - **40-60%**
- риск развития РЯ - **15-45%**

Женщины с мутацией гена *BRCA2*:

- риск развития рака РМЖ на протяжении жизни - **50-85%**
- риск развития РЯ - **10-20%**

У мужчин с мутацией гена *BRCA2*:

- риск развития рака РМЖ на протяжении жизни составляет **6%**, что в 150-200 раз выше, чем в обычной популяции
- риск развития рака предстательной железы, кишки, гортани, кожи и эндометрия, также как и лейкемии вследствие химиотерапии, повышается при наличии мутаций гена *BRCA*

Общие особенности:

- **5-летняя выживаемость больных наследственным РМЖ - 75%** (общепопуляционная - 43%)
- **не чувствительны к таксанам**
- **высокочувствительны к антрациклинам и препаратам платины**
- **относятся к группе «трижды негативных» опухолей**

BRCA-ассоциированный РМЖ при беременности и лактации:

- встречается у женщин в возрасте 32 – 38 лет (1 случае на 3000 беременностей).
- ранняя диагностика опухоли молочных желез у беременных женщин, либо женщин, кормящих грудью затруднена - физиологическое изменение в ткани молочных желез в виде их нагрубания и увеличения в размере.

Перспективные направления ПЦР-исследований Фармакогенетика

❖ Высокий риск опасных осложнений:

- высокая токсичность
- узкий терапевтический коридор
- длительность курса

❖ Высокая стоимость препарата

❖ Недопустимость промедления

Фармакогенетическое тестирование может идентифицировать генотипы, ассоциирующиеся с индивидуальной чувствительностью к ряду препаратов, например, непрямым антикоагулянтам (Варфарин) и антиагрегантам (Клопидогрел)

Расчет дозировки варфарина

Возраст: Показание:

Вес: кг Целевое МНО:

Рост: см Амиодарон:

Пол: Статины:

Раса: VKORC1 -1639:

Курение: CYP2C9:

CYP4F2 V433M:

Рассчитать

Очистить

Справка

ЗАО "НПФ ДНК-Технология" www.dna-technology.ru

<http://www.warfarin.ru/calculator.aspx>

Расчет дозировки варфарина

Возраст: **36** Показание: **другое**

Вес: **65** Целевое МНО: **3**

Рост: **170** Амиодарон: **Нет**

Пол: **Женский** Статины: **Нет**

Раса: **Европеоидная** VKORC1 -1639: **СТ (AG)**

Курение: **Нет** CYP2C9: ***1 / *1 (*2 - CC, *3 - AA)**

CYP4F2 V433M: **СТ**

Поддерживающая доза: **5.9** мг/день

Данный сервис разработан ЗАО «НПФ ДНК-Технология» для использования в рандомизированном исследовании, проводимом совместно с ФГУ «Российский кардиологический НПК Федерального агентства по высокотехнологичной медицинской помощи» и компанией «Никомед». Расчет осуществляется по модели Gage et al., Clin Pharmacol Ther. 2008; 84(3): 328–331 (www.warfarindosing.org).

Окончательное решение о назначении дозировки варфарина принимает лечащий врач!

ЗАО "НПФ ДНК-Технология" www.dna-technology.ru

Перспективные направления ПЦР-исследований *Иммуногенетика. Интерлейкин 28В*

- ❖ Определение полиморфизмов ИЛ 28В позволяют прогнозировать вероятность достижения УВО с чувствительностью более 60 % и специфичностью около 80 %.
- ❖ У больных с благоприятным генотипом и быстрым вирусологическим ответом возможно укорочение сроков лечения до 24 недель.

Режим лечения
ПЕГ ИФН длительность
Рибавирин длительность
ППА длительность

Факторы хозяина
Возраст, пол, раса,
ожирение,
инсулинорезистентность
Генетические факторы
(IL28B)

**Факторы ответа на
ИФН + РИБ + ППА**

Факторы болезни
Стадия фиброза, стеатоз,
коинфекция (ВГВ, ВИЧ)

Факторы вируса
Генотип
Уровень РНК HCV
Квазивиды
(мутации резистентности)

Спасибо за внимание!