

II Всероссийская конференция

«Регистры доноров костного мозга: сегодня и завтра».

30 БИОХИММАК

КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД В ОРГАНИЗАЦИИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЙ И ЛАБОРАТОРИЙ ТРАНСПЛАНТАЦИОННОЙ ДИАГНОСТИКИ

Гулидова Оксана Владимировна,
ЗАО «БиоХимМак»

Член Европейской организации иммуногенетиков
12-13 марта 2020 года



Основная цель регистров доноров КМ - обеспечение онкогематологических больных донорами гемопоэтических стволовых клеток для аллогенной (неродственной) трансплантации.



Трансплантационная диагностика



Комплекс диагностических тестов, обеспечивающих:

1. Определение генетической совместимости между донором и реципиентом (HLA-типирование)
2. Выявление иммунологической несовместимости (сенсibilизации к тканевым антигенам донора)
3. Мониторинг донорского химеризма



Трансплант-
диагностика



Клиническая
молекулярная
диагностика


IMMUCOR®

Luminex®

GENDX

 **CareDx**®
Your Partner in Transplant Care


БИОХИММАК

 **GeneFinder**™


QIAGEN

 **BECKMAN
COULTER** *Life Sciences*

ThermoFisher
SCIENTIFIC

MRC-Holland
MLPA®

 **AmpliSens**®


ТЕСТ ГЕН®
ГЕНЕТИКА НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ



1

Определение генетической совместимости между
донором и реципиентом

HLA-типирование в эпоху NGS

- В 1000 раз быстрее метода Сенгера
- В 4 раза дешевле метода Сенгера
- Без неоднозначностей





Общая концепция автоматизации 3-х этапов HLA-NGS процесса на анализаторе Illumina

QiaSymphony, Qiagen



1. Зона пре-ПЦР

- Экстракция ДНК
- Сборка ПЦР смеси



Veriti

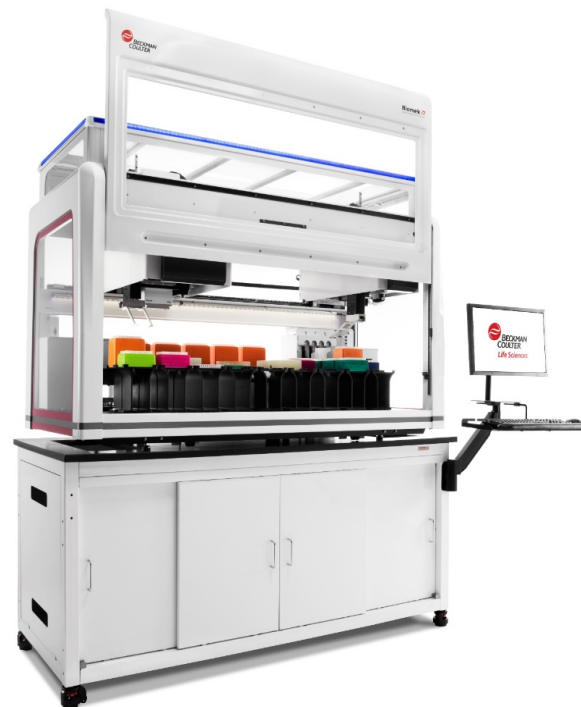


2. Зона пост-ПЦР

- Амплификация
- Автоматизированное приготовление библиотеки ДНК
- загрузка MiSeq



Biomek i7 (Beckman Coulter)



MiSeq Illumina



Широкие возможности пробоподготовки на станции QiaSymphony (РУ №ФСЗ 2011/09242)



Набор реагентов QIASymphony SP	Исходный материал и количество
QIASymphony Virus/Bacteria	Выделение нуклеиновых кислот вирусов из образцов объемом до 1000 мкл плазмы, сыворотки или спинномозговой жидкости. Выделение нуклеиновых кислот вирусов и ДНК бактерий из образцов объемом до 800 мкл мокроты дыхательных путей, мочи, кала, транспортных средств или мазков, высушенных воздухом
QIASymphony DNA	Выделение ДНК из образцов цельной крови объемом до 1000 мкл, лейкоцитарной пленки 400 мкл, ткани 50 мг или клеток 1×10^7
QIASymphony DNA Investigator	Выделение ДНК из широкого спектра биологических объектов для генетической идентификации личности и для проведения судебно-генетической экспертизы.
QIASymphony AXpH ДНК	Выделение ДНК из образцов клеток на основе транспортной среды при использовании технологии AXpH
QIASymphony RNA	Выделение всех РНК из ткани 50 мг или 1×10^7 клеток
QIASymphony PAXgene® Blood RNA*	Выделение клеточных РНК из цельной крови человека 2,5 мл, отобранных при помощи пробирок для РНК крови PAXgene
QIASymphony CF DNA	Выделение свободно циркулирующей ДНК
QIASymphony Ni-NTA Native	Выделение 6xHis-маркированных белков из образцов E. coli объемом до 5 мл или из $2,5 \times 10^7$ эукариотических клеток
QIASymphony Ni-NTA Denaturing	Выделение 6xHis-маркированных белков из образцов E. coli объемом до 5 мл или из $2,5 \times 10^7$ эукариотических клеток



Самый экономичный и производительный метод экстракции геномной ДНК



QIAcube HT, Qiagen, Германия



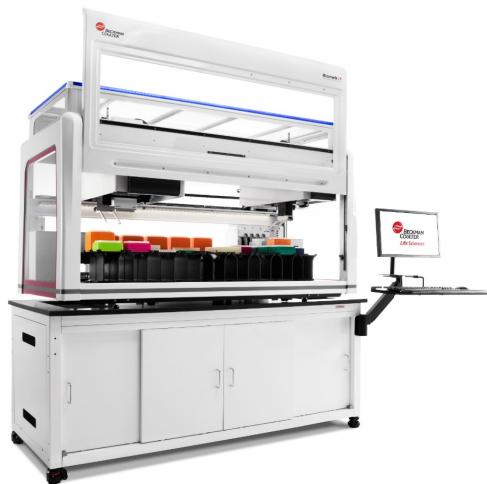
Specification	Description
Number of samples	24–96 samples (to be processed in increments of 8)
Sample input volume	Blood: up to 200 µl (for sample volumes less than 200 µl, add PBS) Cells: up to 5 x 10 ⁶ cells
Elution volume	200 µl (default)
Duration	96 samples in approximately 96 minutes
Стандартный выход	5 мкг ДНК в 200 мкл.
Состав набора	5 плашек по 96 образцов = 480 выделений
Требует пластик	QIAcube HT Plasticware (950067) = 480 выделений



Кат №	Наименование
9001794	Система экстракции ДНК QIAcube HT
51331	Набор для выделения ДНК QIAamp 96 DNA (480)
950067	Наконечники с фильтром 200 мкл (480)



Автоматизация (Beckman Coulter)



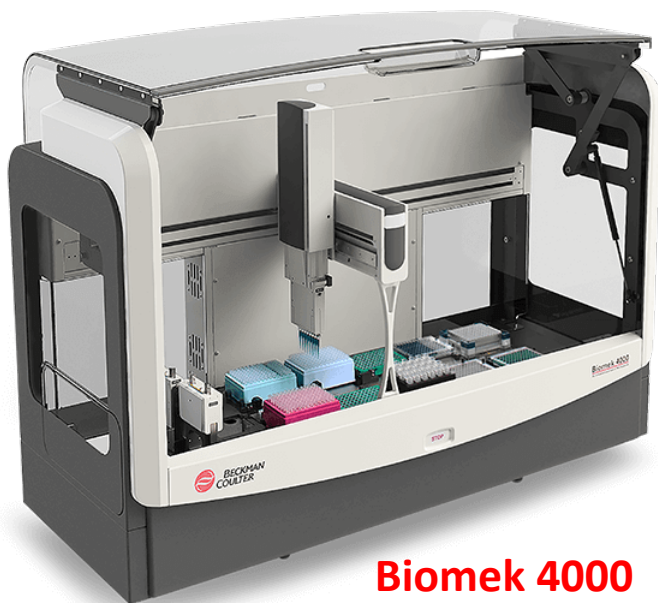
throughput	
Low	Biomek 4000
Medium	BioMek i5
High	Biomek i7



На сегодняшний день существует 2 готовые к использованию роботизированные платформы для автоматизации процесса приготовления NGS библиотек под HLA-типирование в зависимости от потока образцов

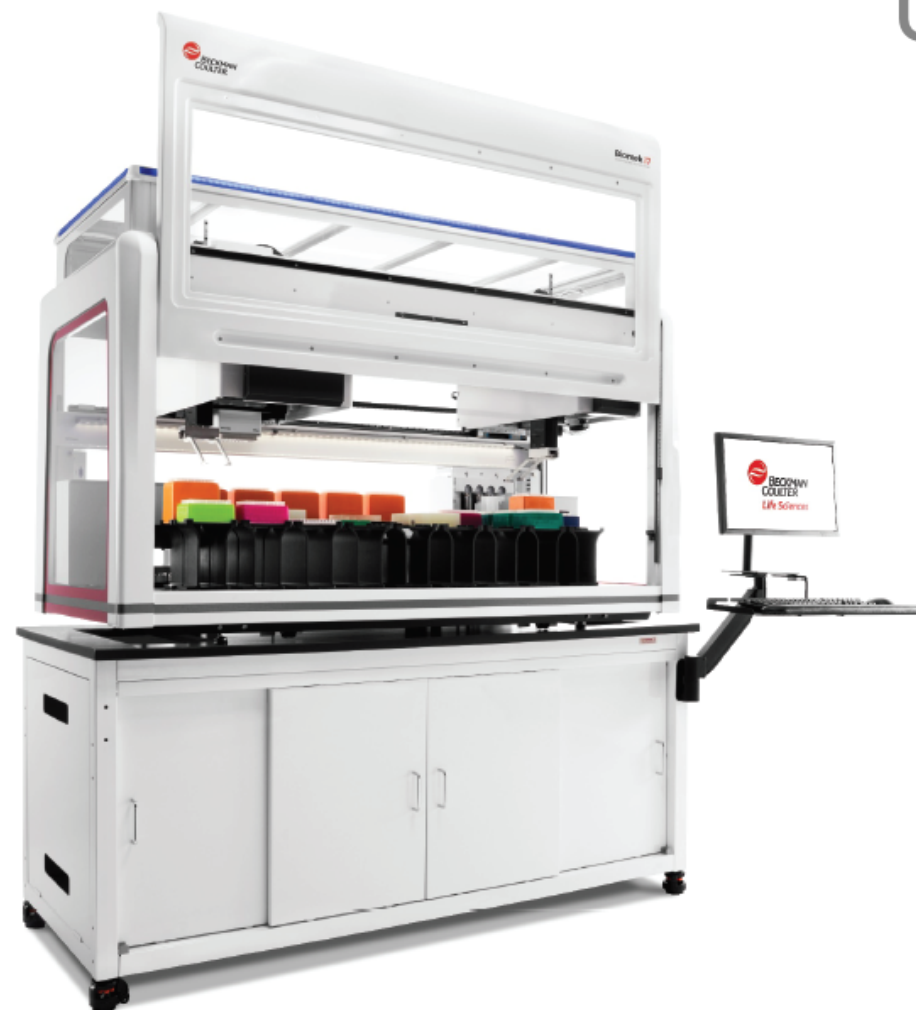


GENDX



Biomek 4000

Поток	Модель робота	Кол-во образцов
Низкий	Biomek 4000	4-24
Высокий	Biomek i7	96 или 192

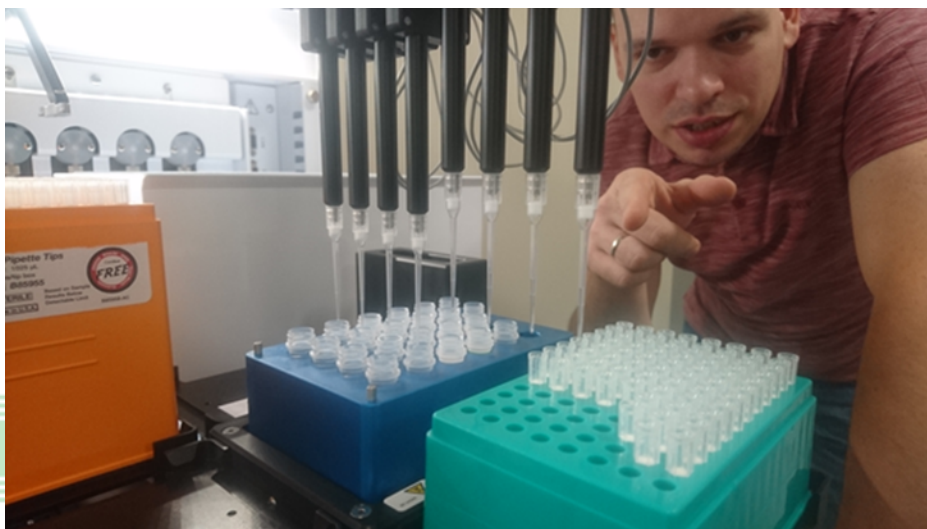


Biomek i7



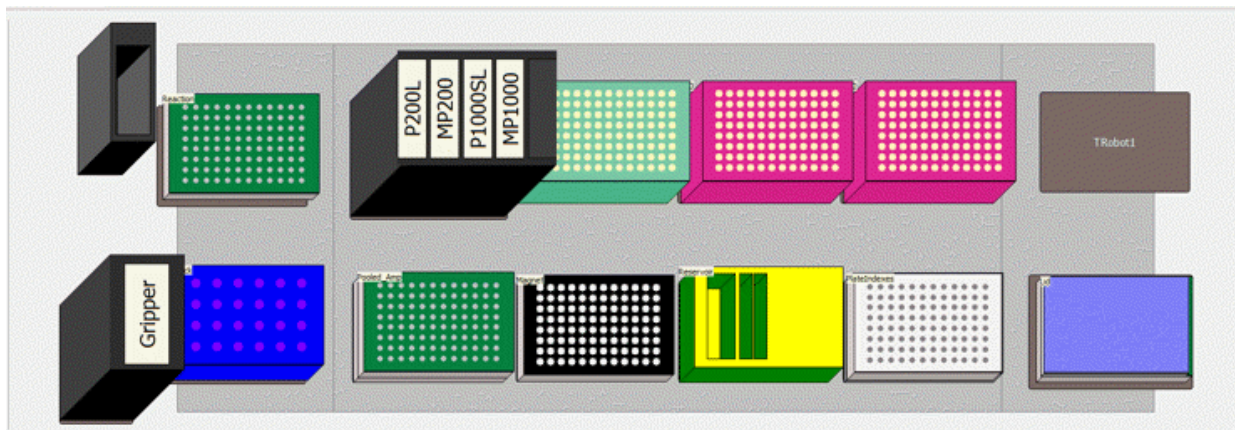
Роботы Biomek Beckman Coulter

- Имеет возможность интегрировать на борту различные устройства, используемые в ходе ручной пробоподготовки библиотек ДНК
- Выполняет полный цикл операций подготовки библиотек ДНК для NGS посредством создания готовых протоколов
- Производительность от 8 образцов в цикле до создания непрерывных конвейеров с периодической дозагрузкой пластика и реагентов.



Biomek4000 NGSgo workflow_2017

- От 4 до 24 образцов
- 1 - 11 локусов за прогон
- Полная автоматизация процесса приготовления библиотеки NGSgo
- Только 3 коробки с наконечниками для всех этапов приготовления библиотеки в протоколе NGSgo



Biomek i7



- Один или два **дозирующих модуля**
- Один или два **гриппера**
- Многофункциональная дозирующая система **Span-8** с независимыми каналами
- Диапазон дозирования от 0,5 мкл до 5 000 мкл
- 45 рабочих позиций на рабочем столе
- Встроенная промывочная станция для наконечников
- Модульный дизайн системы
- Возможность интегрировать различное оборудование
- Одновременная обработка до 192 образцов



GenDx и Биохиммак



Компания «Биохиммак» с мая 2015 года является официальным и эксклюзивным дистрибьютором компании GenDx (Нидерланды) – одного из мировых лидеров в производстве наборов для HLA-секвенирования

Главные характеристики NGS технологии GenDx

- **Мультиплексный анализ** позволяет сделать весь протокол анализа за 1 день
- Возможность использования как мультиплексного формата наборов (на 5, 6 и 11 локусов), так и полокусный вариант исполнения.
- **Возможность работать как на малых так и на больших потоках образцов.**
- При использовании анализатора MiSeq минимальная эффективная загрузка – 6 образцов. Максимальная эффективная загрузка 288 образцов.
- **Программное обеспечение NGSenging** для интерпретации результатов сочетает высокую скорость и автоматизацию анализа с простотой интерфейса.
- Подробный развернутый модуль статистической обработки данных
- Способна обрабатывать все результаты секвенирования полученные на любых платформах и любых реагентных системах



2

Выявление иммунологической несовместимости по сенсibilизации к тканевым антигенам. Тесты на HLA-антитела

- Показаны при гаплоидентичной трансплантации
- При аллогенной трансплантации
- При трансплантации солидных органов





Области применения мультиплексного анализа Luminex



Luminex



Трансплантдиагностика Immucor



Аутоиммунные заболевания Zeus



Инфекционная диагностика Mikrogen

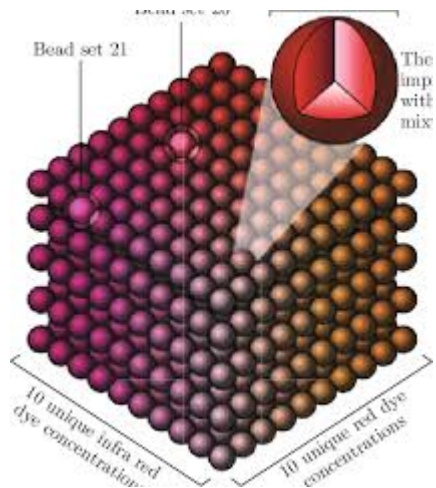
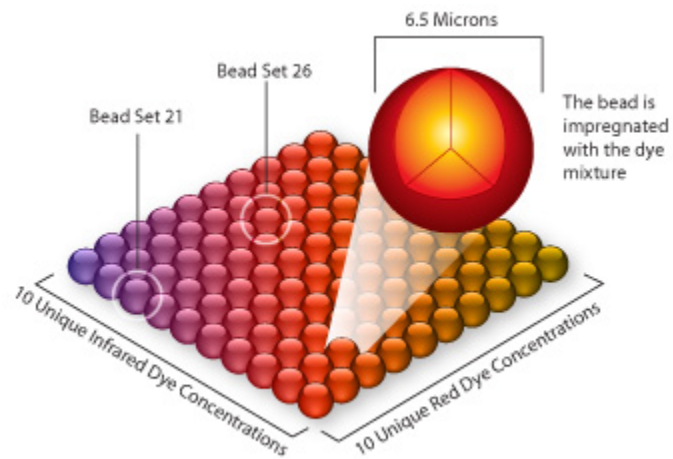


Цитокины и другие иммунологические маркеры
(eBioscience, Bio-Rad, Invitrogen)

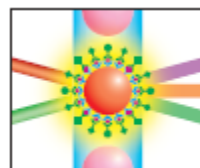
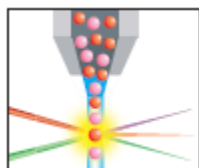
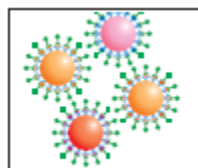
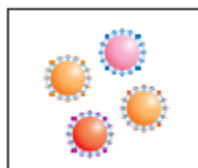
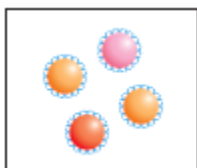
Другие приложения (аллергодиагностика, miRNA, пр.)



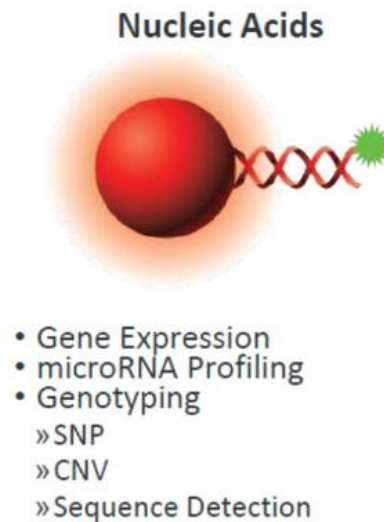
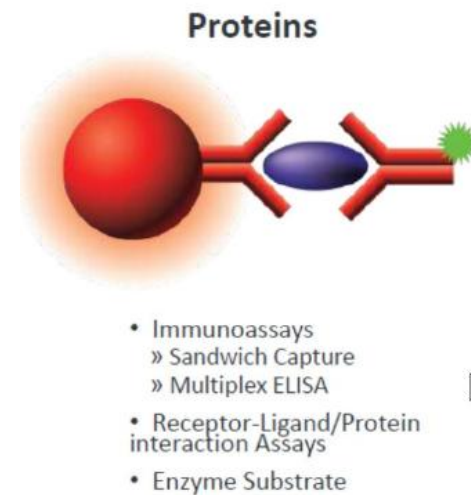
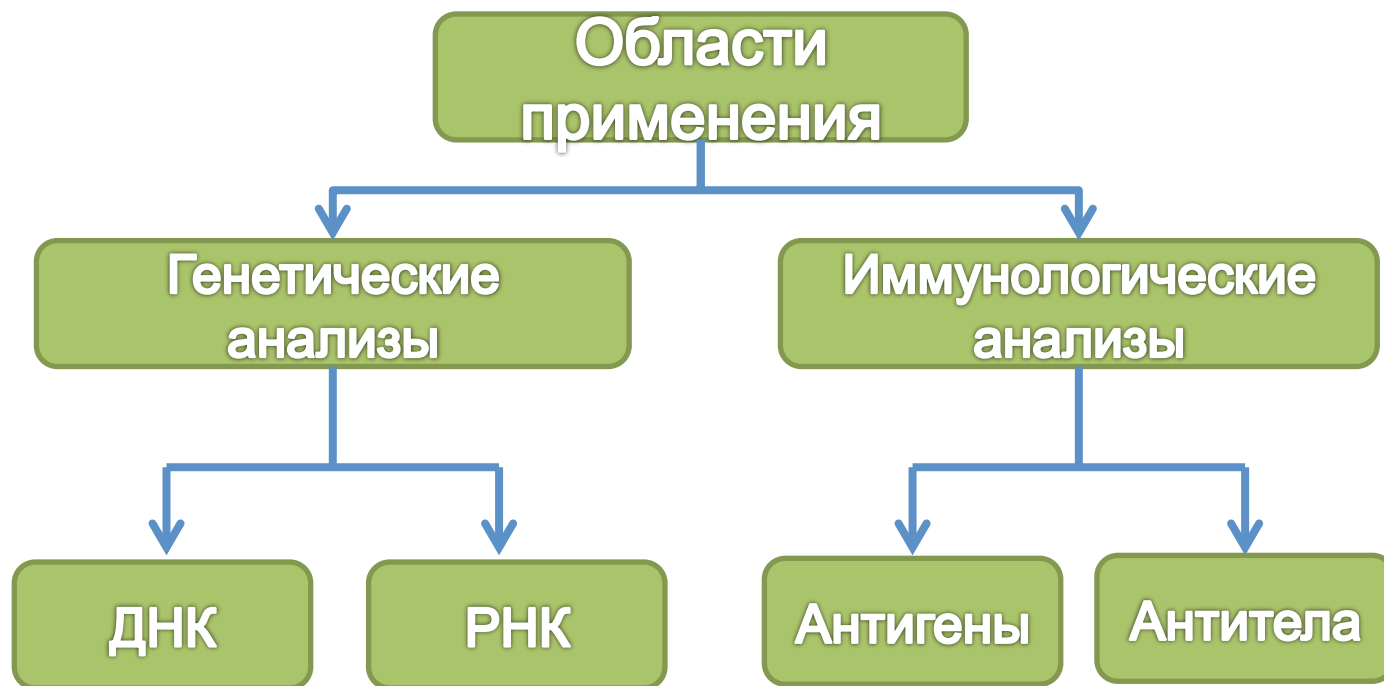
Принцип xMAP-технологии



- Анализ проводится на микрочастицах:
- 2 красителя = 100/500; цветов = 100/500 типов частиц
- Каждая микросфера имеет свою уникальную «спектральную характеристику»
- Возможно проведение анализа до 100/500 различных аналитов в каждом образце одновременно!



Виды анализов



Уникальные возможности мультиплексного анализа Luminex



- HLA-типирование с разрешением Low Resolution-Medium Resolution
- Анализ пред-трансплантационных и пост-трансплантационных HLA антител
- Определение антитромбоцитарных антител
- Производительность от 1 до 96 тестов в прогон
- Время считывания одного результата 30 секунд
- Время проведения всей методики от амплификации до получения результата 2,5 часа
- БиоХимМак обслуживает 37 лабораторий мультиплексного анализа в РФ и СНГ



3

Диагностика химеризма и минимальной резидуальной болезни

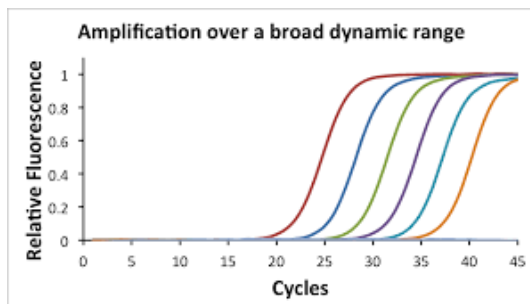
- Real-Time метод
- Высокая точность
- Высокая чувствительность
- Стандартизация
- Сохранение и архивирование протоколов



Метод Real Time как универсальный инструмент ПЦР лаборатории



- HLA-типирование по локусам **ABCRDDQ**
- HLA-B27, HLA-57:01
- Оценка донорского химеризма
- Оценка плотности финальной библиотеки методом RealTime PCR как заключительный этап пробоподготовки NGS библиотеки
- Диагностика транслокаций и делеций
- Диагностика инфекций



Семейство анализаторов Quant Studio

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Key features	Simply accessible	Ultimate simplicity	Total control		Room to grow	More versatility	Maximum productivity
System	QuantStudio 1	QuantStudio 3	QuantStudio 5		QuantStudio 6 Flex	QuantStudio 7 Flex	QuantStudio 12K Flex
							
Colors	3	4	6 with 21 filter combinations	5	5	6 with 21 filter combinations	6 with 21 filter combinations
Block formats	96-well, 0.2 mL	96-well, 0.1 mL 96-well, 0.2 mL	96-well, 0.1 mL 96-well, 0.2 mL	384-well	96-well, 0.1 mL 96-well, 0.2 mL 384-well	96-well, 0.1 mL 96-well, 0.2 mL 384-well TaqMan Array Card	96-well, 0.1 mL 96-well, 0.2 mL 384-well TaqMan Array Card OpenArray Plates
Block change	Fixed				Block change from front in less than 1 min; no tools required		



Дистанционное управление и анализ данных

Управление: Stand-alone, компьютер или Облако

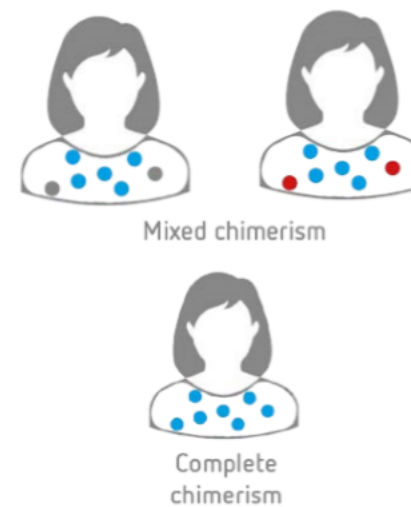
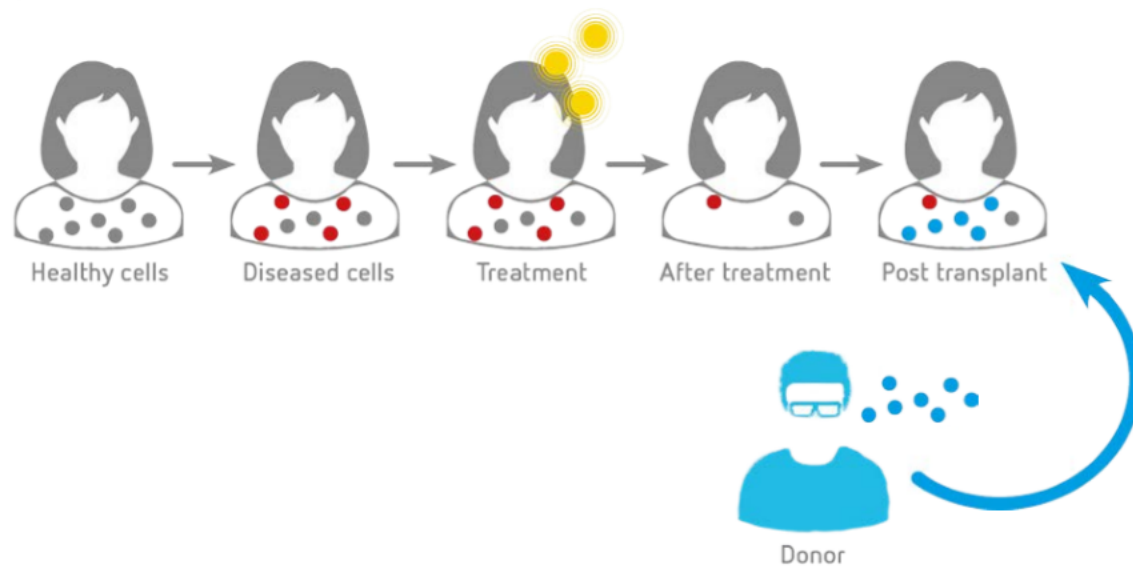


Дистанционное управление и анализ данных



Chimerism

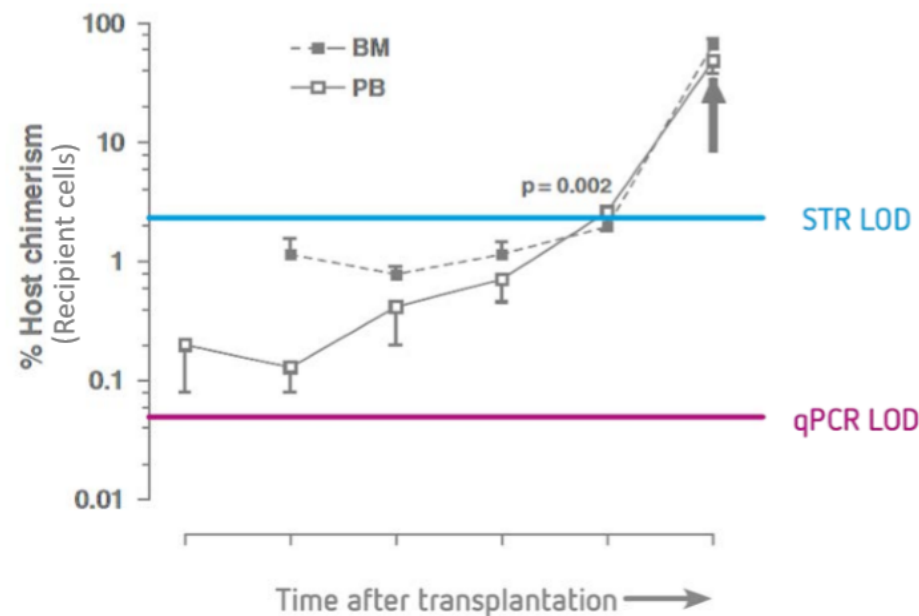
- Healthy cell
- Diseased cell
- Donor cell



GENDX

Why qPCR?

- qPCR: high sensitivity (0.05%)
 - Detects recipient cells before relapse
- STR: less sensitivity (1-5%)
 - Confirms relapse
 - No anticipation possible



GENDX

Jimenez et al, Leukemia, 2005

For Research Use Only (RUO)

3

Chimerism monitoring: 2 steps

1. Genotyping

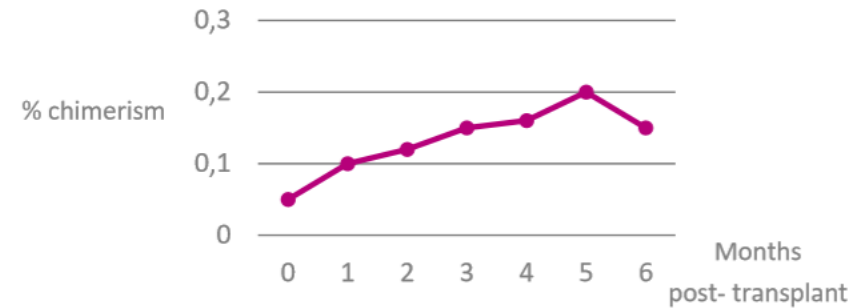
Recipient



Donor



2. Monitoring



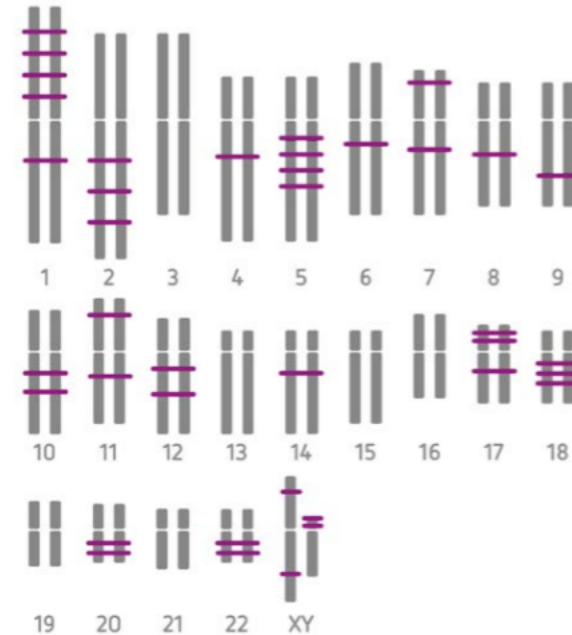
GENDX

For Research Use Only (RUO)

4

KMRtype[®] Genotyping

- 39 markers:
 - Core kit with 30 markers: 10 mixes
 - Extended kit with 9 markers: 3 mixes
- Full kit with 30 markers: 10 mixes
 - plus KMRassay



GENDX

For Research Use Only (RUO)

9

Секвенирование по Сенгеру и фрагментный анализ



HLA-типирование
методом секвенирования
наборами AlleleSEQR

ThermoFisher
SCIENTIFIC



digital**MLPA**

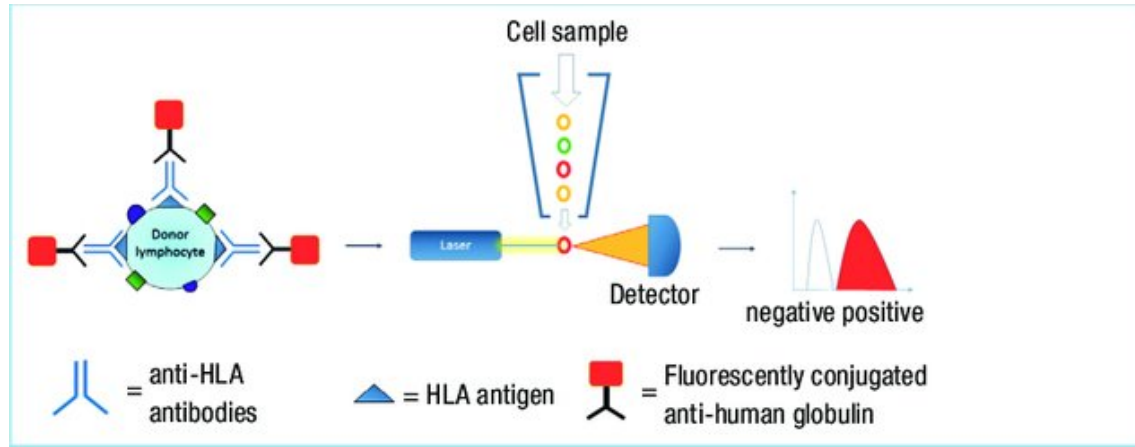
Фрагментный анализ
для диагностики мутаций
наборами MLPA



Flow Cytometry Crossmatch



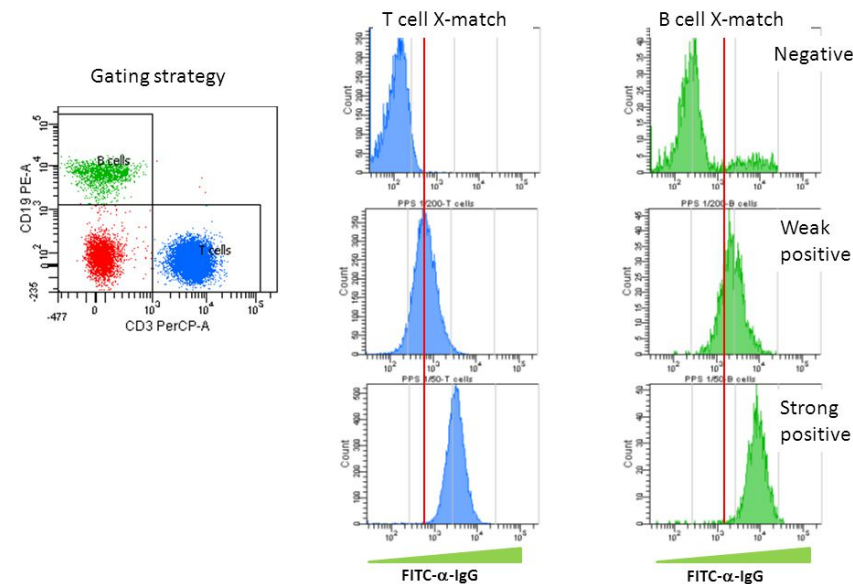
Принцип метода



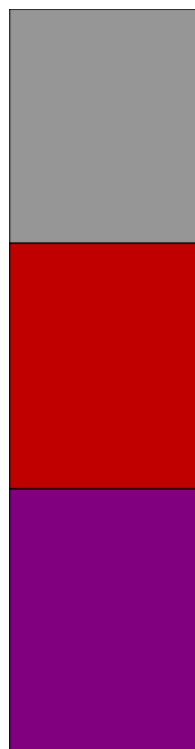
NAVIOS



Flow Cytometry Crossmatch



QuantiFERON®-TB Gold IT – оценка латентного туберкулеза у иммунокомпроментированных людей



Отрицательный контроль

Специфические антигены
Mycobacterium tuberculosis
ESAT-6 / CFP-10 / TB 7.7

Митоген (ФГА)



- 120 человек сотрудников
- Выпускники МГУ и медицинских вузов
- Отдел ИФА
- Отдел цитометрии
- Отдел биохимии и гематологии
- Отдел экспресс диагностики
- Отдел молекулярной и трансплантационной диагностики
- Отдел ЛИС

30 БИОХИММАК

hla@biochtmack.ru

отдел трансплант-диагностики БиоХимМак

