

На пороге революционных свершений

Молекулярная диагностика (MDx) – раздел диагностических исследований *in vitro*, включающий все специфические методы анализа нерегулярных биополимеров – ДНК, РНК и белков. MDx является основой персонализированной медицины.

Молекулярная диагностика стала быстрыми темпами развиваться за рубежом в 1991–2001 гг. В 1991 г. появилась первая публикация Cetus по методу TaqMan. В дальнейшем от Cetus права и патенты на использование ПЦР получила корпорация Hoffmann-La Roche, после чего была основана компания Roche Molecular Systems, начавшая клиническое внедрение MDx.

В это же время были разработаны первые приборы для Real-Time ПЦР и роботы для экстракции нуклеиновых кислот (НК), расшифрован геном человека (Nature – HGP, Science – Celera). А в феврале 2002 г. мир облетела сенсационная новость: произошла первая революция в молекулярной диагностике – разработаны автоматические платформы на основе технологий амплификации в режиме реального времени.

За последние годы в мире возросло число научных работ, посвященных идентификации бактерий с помощью масс-спектрометрии. Сформирована обширная база данных нуклеотидных последовательностей всех изученных микроорганизмов: 1710 родов вирусов позвоночных, 135 родов бактерий, 73 рода грибов, 63 рода простейших.

Согласно информации, опубликованной в The Wall Street Journal, Dave Ecker (IBIS, Abbott) в 2009 г. получил золотую медаль за инновационную разработку технологии быстрой идентификации микроорганизмов.

Позднее была разработана технология PLEX ID. Ее основные преимущества: не требуется культивирование, неограниченный спектр патогенов, включая неизвестные, устойчивость к антимикробным средствам.

В настоящее время для идентификации микроорганизмов успешно применяется MALDI-TOF масс-спектрометрия. Стоимость анализа – \$2,30, а его продолжительность – всего 3 мин.

Будущее микробиологической диагностики – это использование схемы быстрой идентификации микроорганизмов методом пиро-



Автор: **Г.А. Шипулин**, к.м.н., руководитель отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора» (Москва)

«Иммуночип» – одноэтапный тест для выявления как антител, так и антигенов для нескольких групп микроорганизмов, сопоставимый или превосходящий по чувствительности ИФА, а по специфичности – иммуноблот.

секвенирования, позволяющей провести идентификацию вирусов, бактерий, грибов, а также выявить их мутации и резистентность: клинический материал → подготовка (15 мин) → пиросеквенирование (10–100 мин) → идентификация (1 мин). Время анализа составляет 60 мин (плашка – 96 образцов). Возможна одновременная загрузка 1–10 плашек.

В отличие от метода пиросеквенирования культуральный метод позволяет достигнуть результата гораздо позже: получение проб + культивирование + масс-спектрометрия → секвенирование + анализ в базах данных.

Положение дел в России

В России в течение последних лет также была создана промышленная база для развития

молекулярной диагностики. Основными участниками отечественного рынка на сегодняшний день являются ЦНИИЭ, компании «ДНК-технология», «Вектор-Бест», «Литех». Разработано необходимое оборудование, в том числе для ПЦР в режиме реального времени, налажена регулярная подготовка кадров (в ЦНИИЭ подготовлено 2300 специалистов), сформирована сеть MDx – около 5000 лабораторий (всего в РФ их около 20 000).

Российский лидер в производстве тест-систем для MDx – Федеральное государственное учреждение науки «Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора» (ФГУН ЦНИИЭ РПН). В месяц эта организация выпускает около 25 000 наборов; около 1000 наименований для диагностики инфекций, генетических мутаций, ГМИ; осуществляет все форматы детекции: электрофорез, ГФл (FER, FRT), ГИФА, секвенирование. В течение года в производство внедряется 20–30 новых наименований тест-систем. Отмечается рост доли комплектов для ПЦР в режиме реального времени (схема 2).

Все большую актуальность приобретает вопрос автоматизации отечественных ПЦР-лабораторий (концепция «закрытой

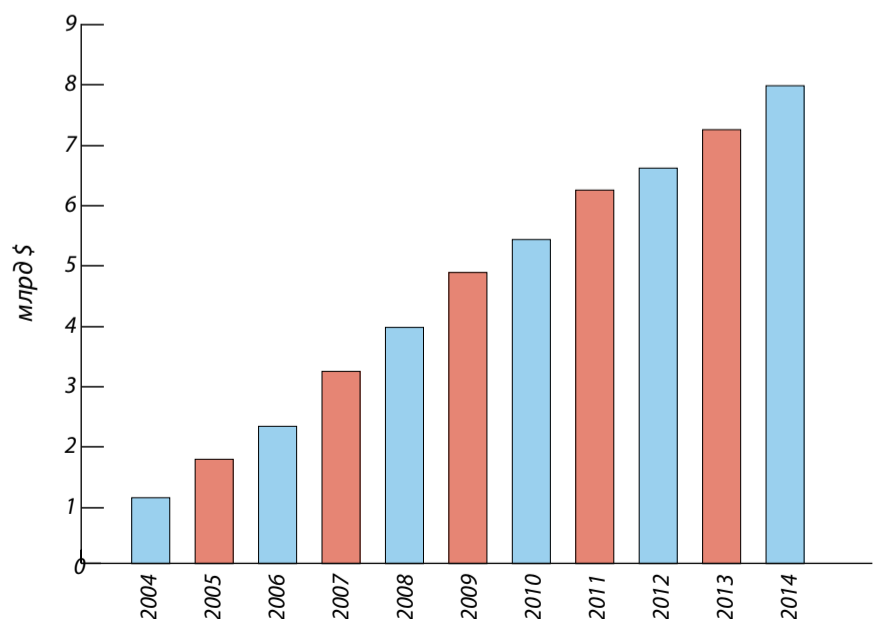


Схема 1. Прогнозы развития рынка биочипов (США)

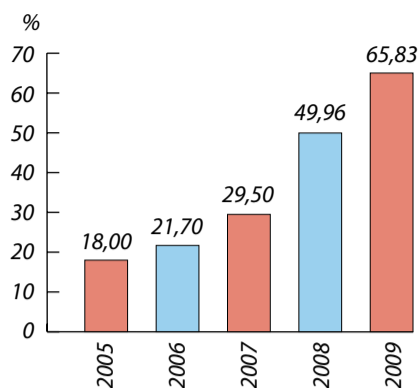


Схема 2. Рост доли комплектов для ПЦР в режиме реального времени

платформы») в связи с их низкой производительностью. В среднем сейчас удается обработать 144 образца в день. При этом цены на тесты довольно ощутимы, а ассортимент невелик (VL HIV, VL HBV, VL HCV). Отмечается высокая стоимость приборов и их обслуживания.

Сравним возможности нескольких зарубежных систем. Например, платформа MDx, разработанная компанией Abbott (M2000 SP + M2000 RT), позволяет выполнить следующие тесты: HIV, VL HBV, VL HCV, HCV 1-6, CT/NG, HR HPV, HSV 1-5, MTB, B19. Ее производительность – 192 образца в день. Платформа MDx компании Qiagen (Qiasymphony SP/SA + RotorGene Q) имеет рекордный ассортимент тестов (AmpliSens + Artus) при производительности 300 проб в день.

Новая автоматическая платформа на основе технологии bDNA компании Siemens – Versant 440 Molecular System – позволяет выполнить тесты VL HIV, HCV, HBV. Ее производительность – 168 образцов в день. А производительность новой автоматической платформы, разработанной специалистами компании Novartis на основе технологии TMA, – Procleix TIGRIS – паразитарна – 500 образцов за 9 часов. Тесты – VL HIV, HCV, HBV.

Биочипы: современное состояние

Согласно данным маркетингового исследования (www.kaloramainformation.com), в США на рынке биочипов отмечается ежегодный прирост около 20% (схема 1). В России же наблюдается несоответствие потенциальных возможностей и состоявшихся внедрений. Тем не менее, несмотря на сложности в разработке, создано несколько клинических приложений. Разрабатываются конкурирующие и базирующиеся на разных технологиях автоматические платформы. Так, компанией «Биочип-ИМБ», которая имеет 50 лабораторий (33 из них в России), производится восемь вариантов чипов, еще два находятся в разработке. В их число входят биочипы для выявления микобактерий туберкулеза и определения их лекарственной чувствительности к рифампицину, изониазиду, фторхинолонам, для идентификации вируса гриппа А, в том числе птичьего гриппа, хромосомных транслокаций при острых хронических лейкозах, генномодифицированных организмов (ГМО) растительного происхождения и др. Специалистами организации разработан анализатор биочипов – аппаратно-программный комплекс, предназначенный для регистрации и последующей математической обработки люминесцентного изображения анализируемого биологического образца (биочипа) при возбуждении лучами двух твердотельных лазерных модулей.

В ФГУН ЦНИИЭ РПН разработаны чипы для серологической диагностики ВИЧ, ВГС, ToRCH-инфекций, боррелиоза, сифилиса, скрининга донорской крови, выявления антигенов особо опасных инфекций (ООИ). Готовится документация для их регистрации. Также создана автоматическая платформа и про-



Immuno Solid-phase Allergen Chip (твердофазный иммуноаллергочип) позволяет идентифицировать 103 аллергена, включая пыльцу деревьев и трав, шерсть, эпителий, экскременты животных, насекомых и их токсины, продукты питания растительного и животного происхождения, лекарственные препараты и консерванты.

водятся работы по организации производства новой продукции.

Системы геномного секвенирования (NGS)

У 65% женщин с диагнозом «инвазивный рак груди» отсутствует поражение лимфатических узлов на момент постановки диагноза.

85% женщин из этой группы в течение следующих 10 лет имеют высокие шансы выживания и низкий риск метастазирования. Однако врачи лечат всех этих больных одинаково, не имея возможности выделить целевую группу.

Преодолеть проблему помогают биочипы. Так, первый биочип



Что сделано за рубежом (1991–2001 гг.)

- Разработаны автоматические платформы для ПЦР и альтернативных методов амплификации.
- Для ряда задач разработаны и внедрены в клиническую практику тесты на основе биочипов для фармакогенетики, молекулярной онкологии, диагностики наследственных болезней.
- Разработаны MDx «тесты у постели больного».

Что не сделано в этот период в России

- Практически не производятся тест-системы для фармакогенетики, отсутствует сеть лабораторий.
- Производство тест-систем для молекулярной онкологии ограничено небольшим списком, сеть лабораторий неразвита. Целым рядом научных центров разработан большой перечень методик для диагностики генетических заболеваний человека, но их применение в медико-генетических лабораториях ограничено.
- Практически отсутствуют на рынке отечественные тест-системы, и слабо развита сеть лабораторий для геномной дактилоскопии.
- Не создана отечественная полностью автоматизированная платформа для MDx.

СРАВНЕНИЕ ЗАРУБЕЖНЫХ ТЕСТОВ НА ОСНОВЕ ТЕХНОЛОГИИ БИОЧИПОВ

Потребительские цели

Компания	Navigenic	23andMe	DeCODE
Тест	Health Compass	23andMe	DeCODEme
Платформа для генотипирования	Affymetrix	Illumina	Illumina
Число SNP	1 000 000	580 000	1 000 000
Предсказываемые, диагностируемые заболевания	18	16	20
Назначение теста	Акцент на прогноз болезни	Акцент на персонализированные данные	Акцент на персонализированные данные
Цена	\$2500	\$999	\$985

Клинические цели

Название теста, фирма	Гены/SNP	Одобрение FDA
AmpliChip Cyp450, Roche Molecular Diag.	Cyp450/ 31 SNP	Да
MammaPrint, Agendia	70 генов	Да
Tissue of Origin, Pathwork Diagnostics	Около 2000 генов	Да

Перспективы использования NGS в микробиологии

Приложения	Примеры	Конечные пользователи
Расшифровка сложных случаев, выявление новых инфекций	Сепсис, простатит, арбовирусы, менингоэнцефалиты	Больницы, Роспотребнадзор, НИИ
Устойчивость к лекарствам	Устойчивость к метицилину, ванкомицину и т. д.	Больницы, Роспотребнадзор
Пищевая промышленность, сельское хозяйство	Бактериальная контаминация, патогены животных и растений	Промышленность, вет. лаборатории
Биобезопасность	Объекты окружающей среды	Роспотребнадзор
Фармпроизводство, МИБП, стволовые клетки и т. д.	Микробная контаминация	Производства, банки стволовых клеток
Внутрибольничные инфекции	MRSA, VRE, Acinetobacter и т. д.	Больницы, Роспотребнадзор

Сур450, зарегистрированный FDA в 2003 г., предназначен для анализа двух наиболее переменных генов цитохрома P450 – Сур2D6, Сур2C19. Эти гены регулируют метаболизм 25% всех назначаемых лекарственных препаратов. Тест генотипирует 32 полиморфизма и делит пациентов в отношении определенного списка лекарств на четыре категории. Около 10 лабораторий в США предлагают провести этот анализ (стоимость около \$1000).

В США ежегодно диагностируется 1 500 000 случаев рака. В 10% случаев патоморфологи не могут установить происхождение опухолевых клеток. Молекулярное же профилирование повышает эффек-

Основные направления современной MDx – молекулярная диагностика наследственных болезней, ИБС, онкологических заболеваний, фармакогенетика.

тивность терапии при онкологических заболеваниях.

Пример результата анализа на чипе Pathwork: у 66 пациентов с резистентностью к стандартной терапии провели исследование с использованием системы Wafergen для амплификации на чипе до 30 000 маркеров. Полу-

ченные данные: 1-я группа – рак молочной железы (27%), 2-я группа – рак толстой кишки (17%), 3-я группа – рак яичника (8%), 4-я группа – рак других органов (48%). Ключевые мутации (молекулярное профилирование) выявлялись Caris Diagnostics (DNA Microarrays + HIS). Схемы терапии подбирали на

основании молекулярных данных. У 27% пациентов удалось добиться устойчивого ответа на вновь подобранную схему терапии.

Секвенирование генома за \$1000 делает ненужными все альтернативные генетические тесты. По сути, это вторая революция в молекулярной диагностике. Ведь по мере пополнения фармакогенетических баз данных станет возможным индивидуальный подбор лекарств. Тем самым решится проблема побочного действия лекарств (ПДЛ), занимающая в США 4-е место среди основных причин госпитализаций и 5-е место среди основных причин смерти. Данные US HMO показывают, что затраты, связанные с устранением последствий ПДЛ, превышают стоимость самого лечения. Таким образом, секвенирование генома раковых опухолей – путь к персонализированной медицине.

Секвенатор PGMS (Ion Torrent) стоит около \$50 000, реагенты на запуск – \$500. Возможна генерация сотен миллионов нуклеотидов за один запуск, при этом длина читаемых фрагментов – несколько сотен, продолжительность одного запуска – 1 час. Перспективы использования NGS в микробиологии – это вопрос времени. Ведь новые технологии за рубежом стремительно дешевеют – стоимость полногеномного секвенирования начинает приближаться к стоимости существующих генетических тестов (схема 3).

Некоторые достижения в этом направлении есть и у нас: в России созданы первые центры NGS, расшифрован геном русского человека, в МГУ формируется информационный центр для быстрой интерпретации результатов секвенирования.

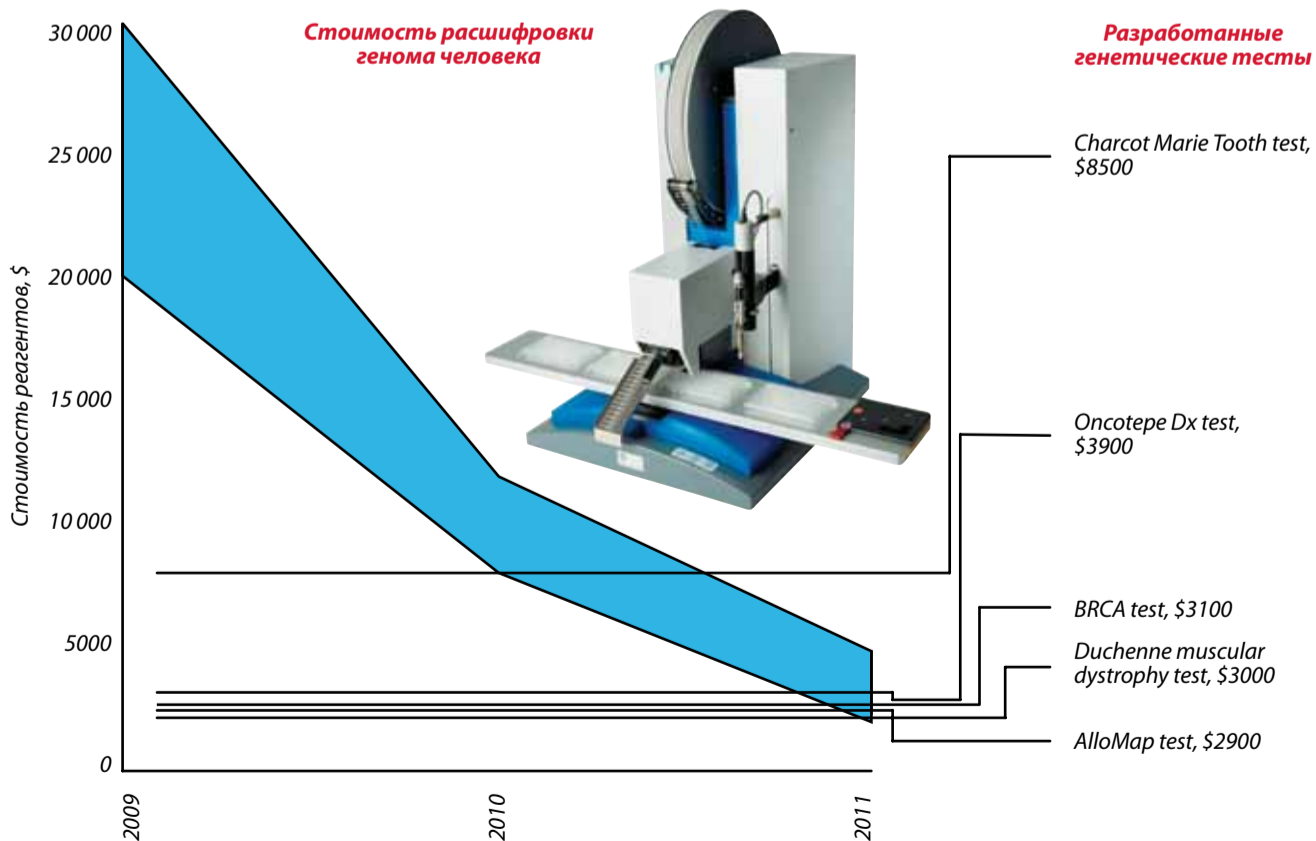


Схема 3. Снижение цен на новые технологии за рубежом