



EUROArray

„Sama sobě zákazníkem“

Mgr. Veronika Žižková, Ph.D.

DNA mikročipy pro rutinní laboratorní
diagnostiku

07. 02. 2024

Sama sobě zákazníkem



Lékařská
fakulta



FAKULTNÍ NEMOCNICE
OLOMOUC

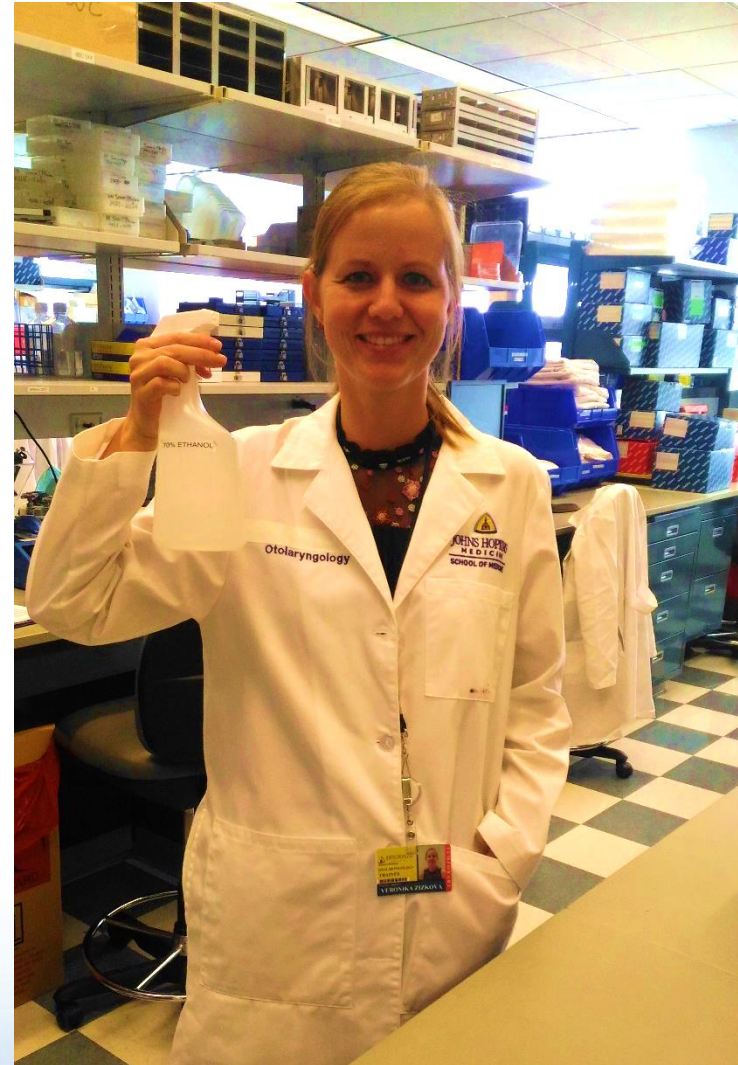
FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT



Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health



JOHNS HOPKINS
UNIVERSITY



fertimed
MAPO Group

DYNEX

Přehled

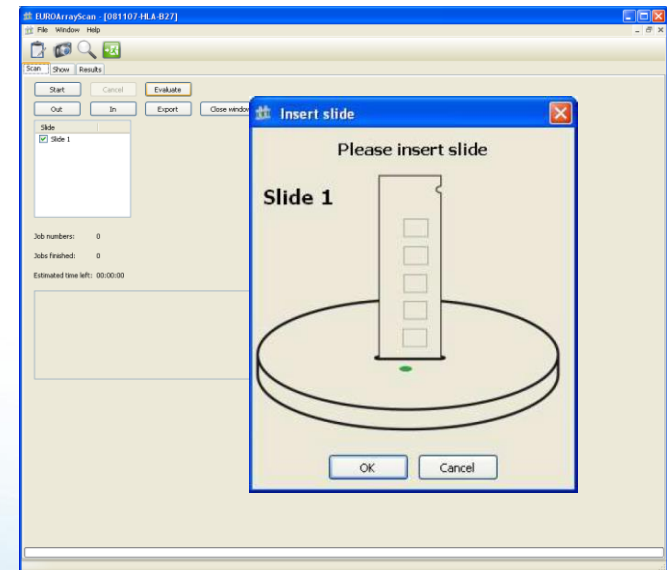
➤ **EUROArray Systém**

- Princip provedení testu
- Přehled dostupných kitů
- EUROArray HLA-DQ2/DQ8 Direct
- EUROArray HLA-B27 Direct
- EUROArray ApoE
- Shrnutí

EUROIMMUN EUROArray System

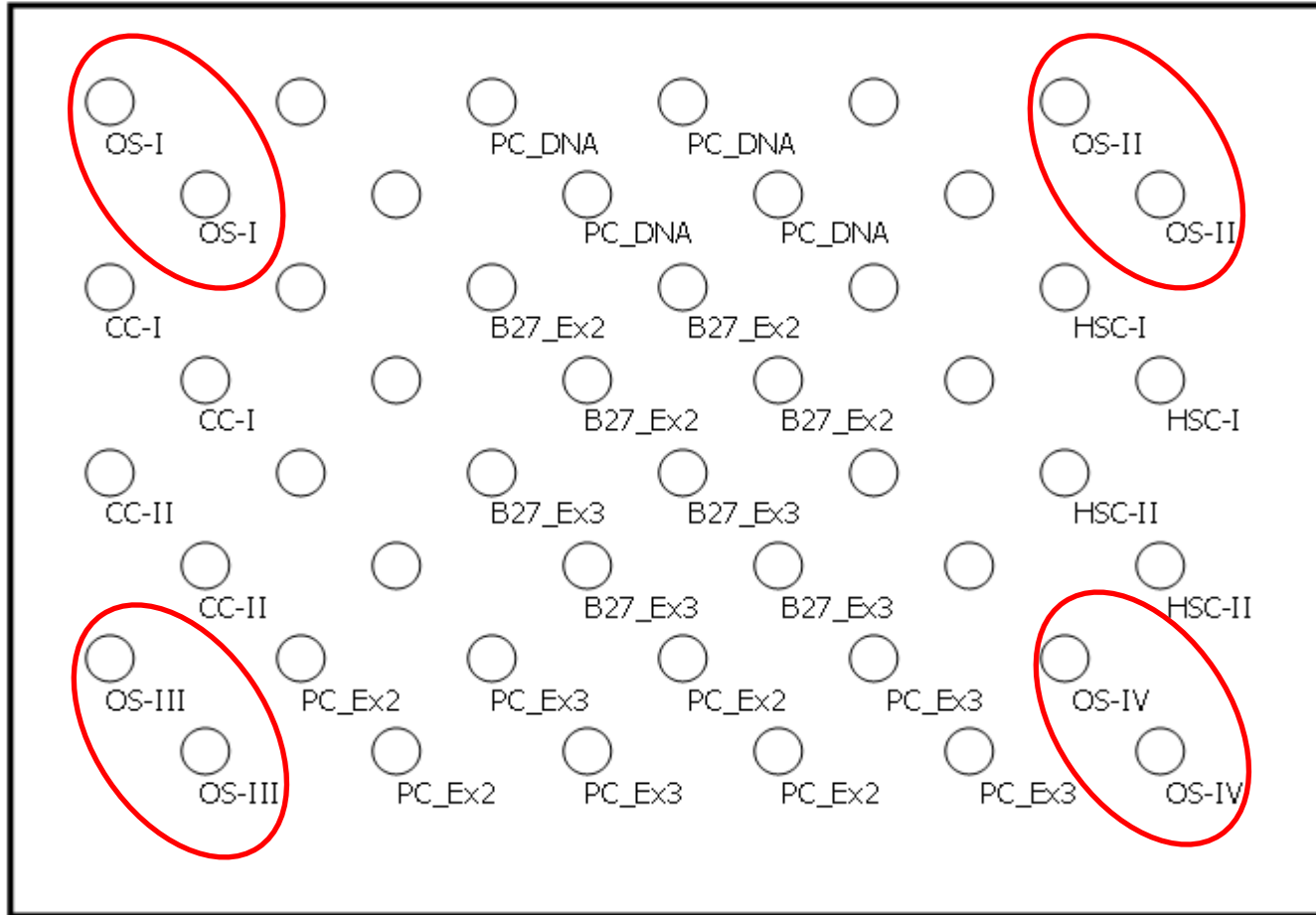
PCR s detekcí na DNA mikročipech - výhody

- 3 nebo 5 čipů na sklíčko
 - Nutná pouze 1 negativní kontrola na celý běh
 - CE-IVD certifikace
 - Plně automatické, standardizované vyhodnocení
 - Možnost připojení na LIS
-
- **Certifikace dle IVD-R**
 - **EUROArray HLA-DQ2/DQ8 Direct**
 - **EUROArray HLA-DQ2/DQ8-h Direct**
 - **EUROArray HLA-B27 Direct**
 - **EUROArray HLA Lactose Intolerant Direct**
 - **Wash reagent 1**
 - **Wash reagent 2**



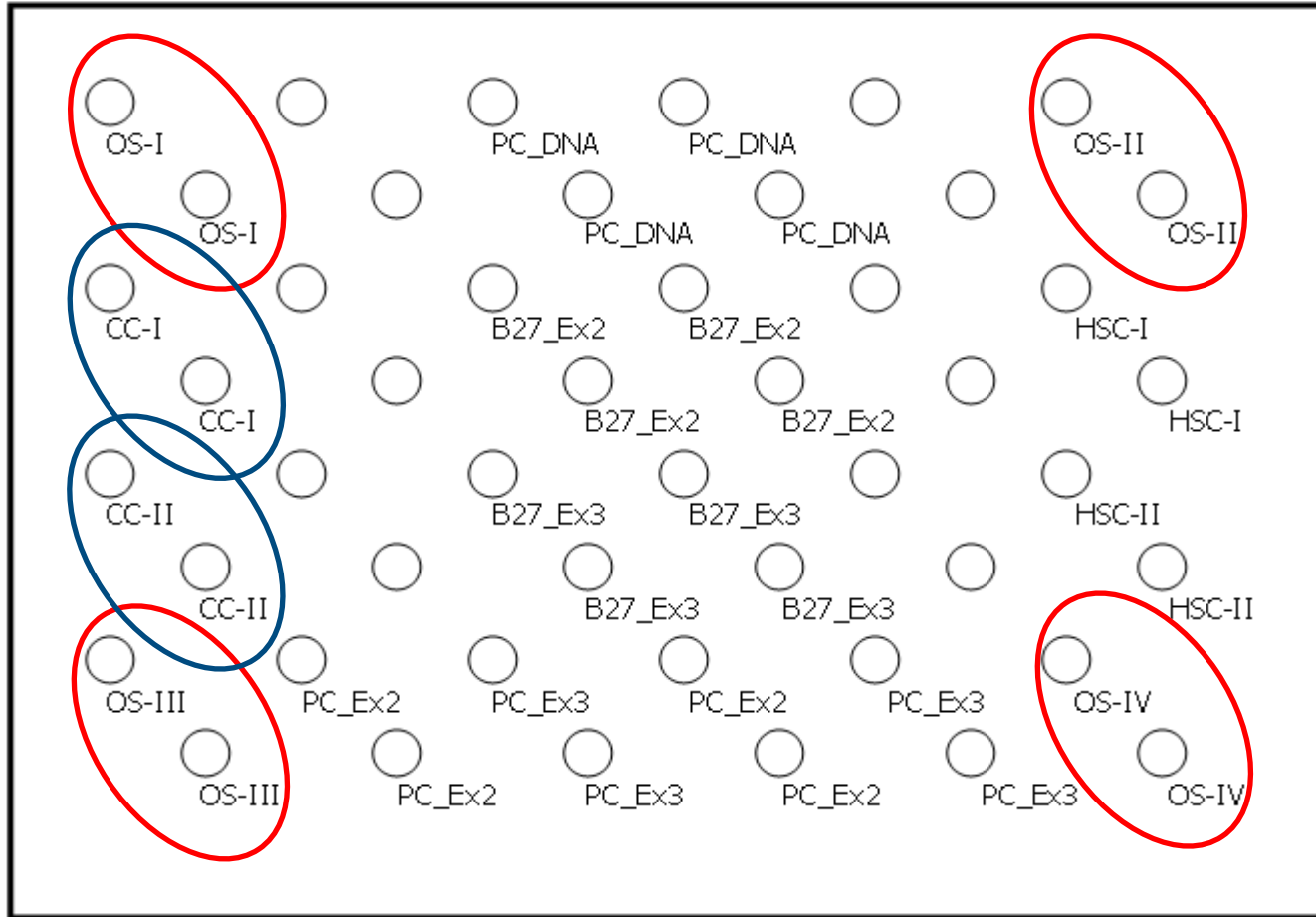
EUROIMMUN EUROArray System

- Komplexní sada kontrol umožňuje ověření správnosti testu pro každý vzorek



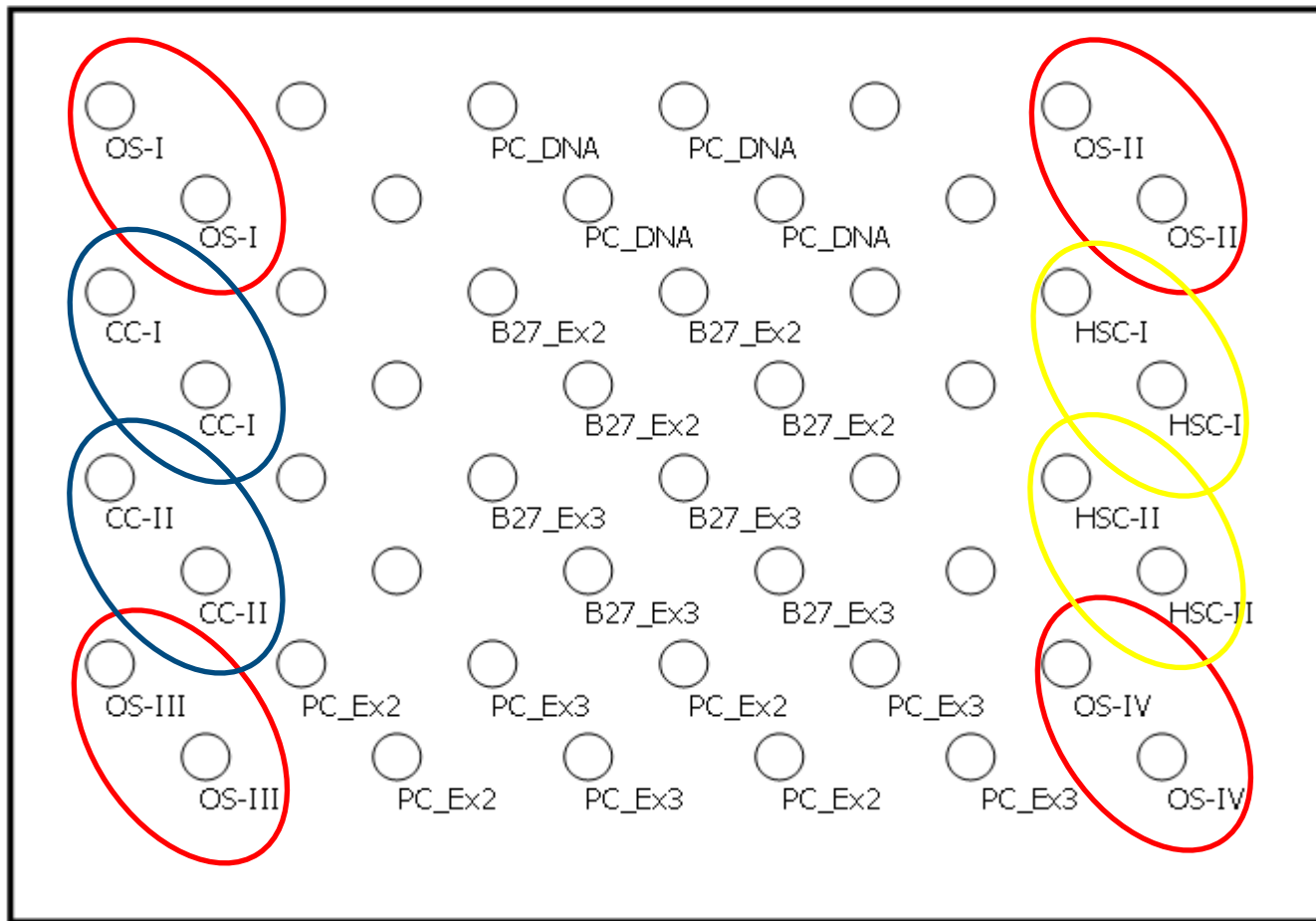
EUROIMMUN EUROArray System

- Komplexní sada kontrol umožňuje ověření správnosti testu pro každý vzorek



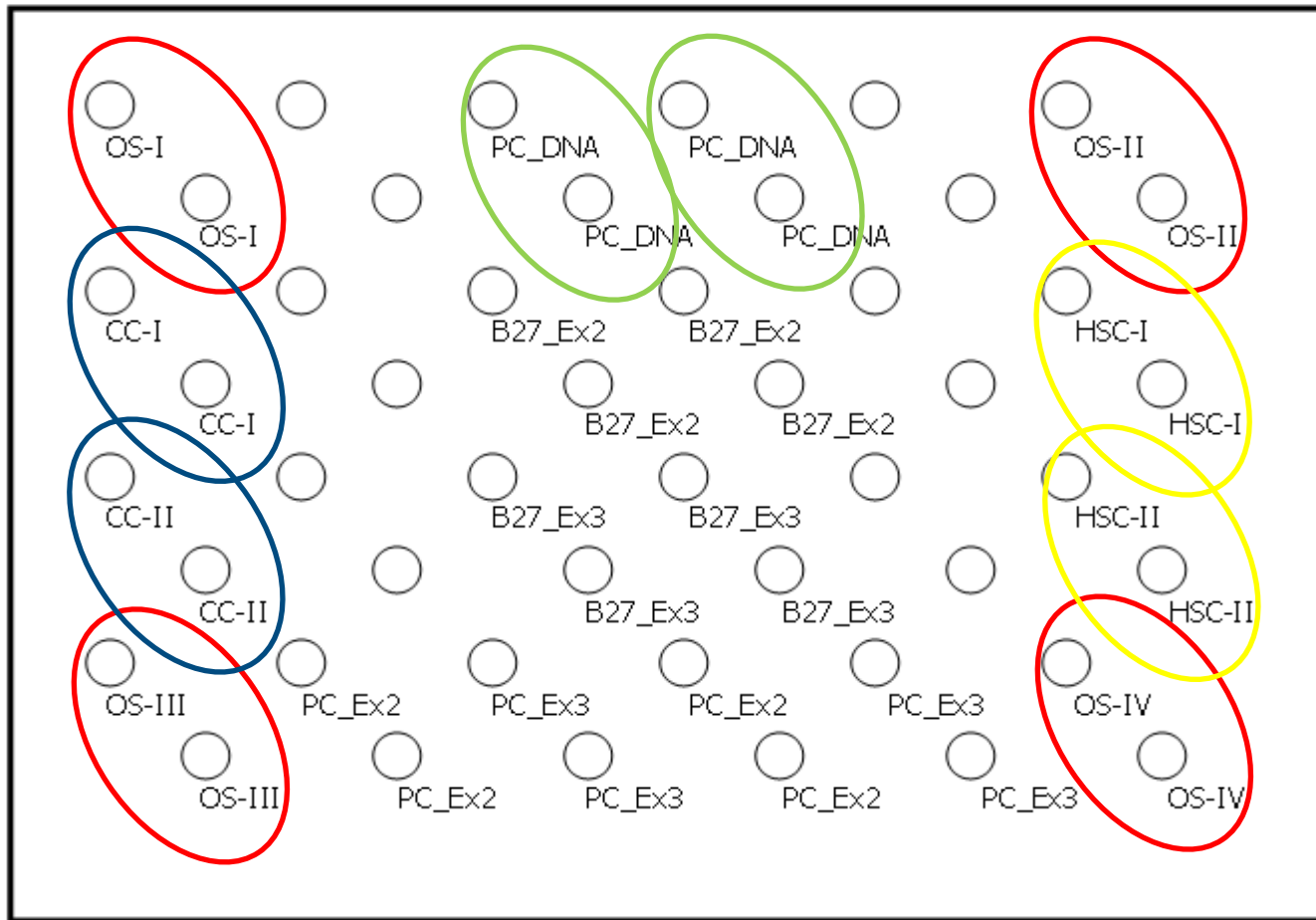
EUROIMMUN EUROArray System

- Komplexní sada kontrol umožňuje ověření správnosti testu pro každý vzorek



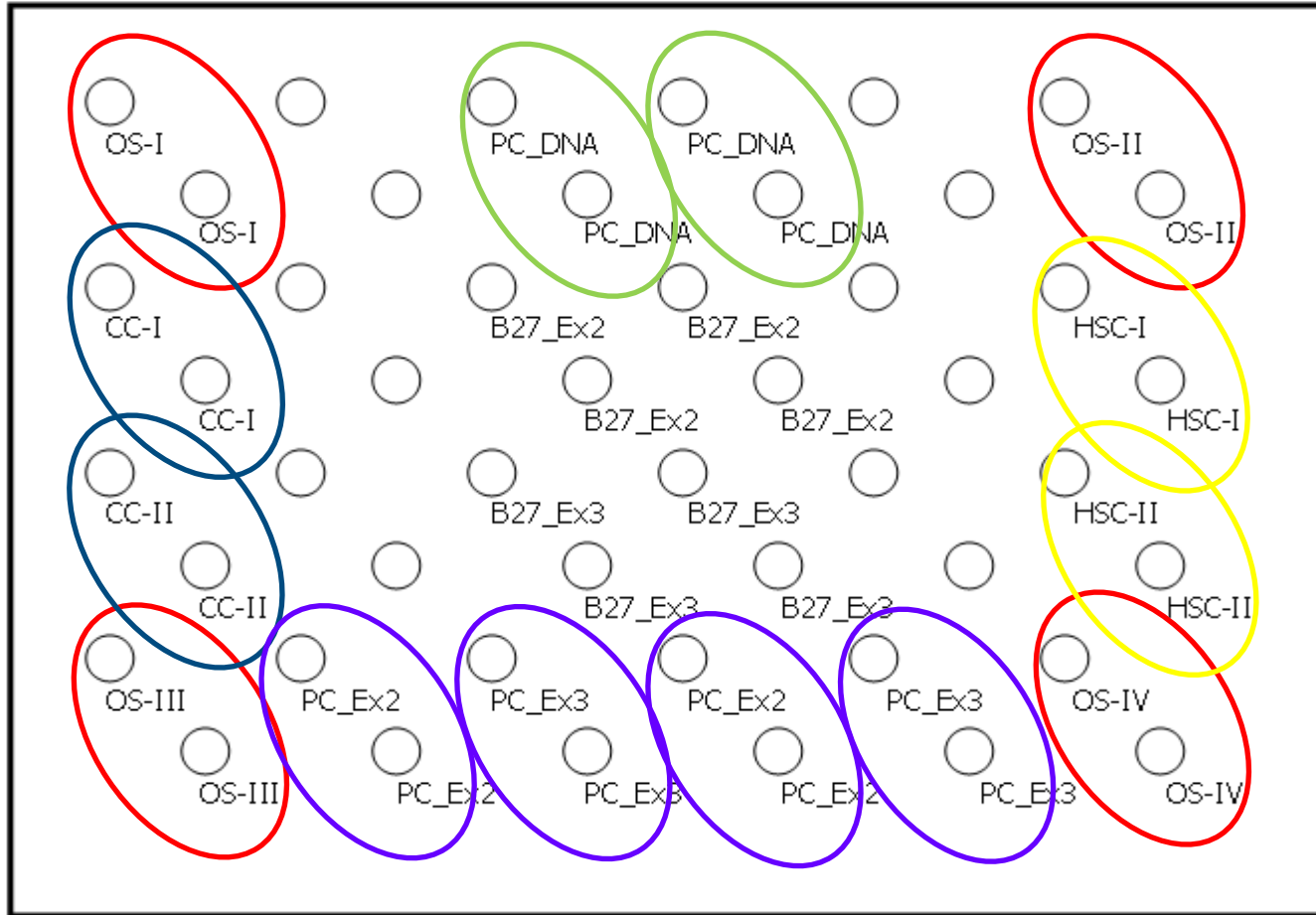
EUROIMMUN EUROArray System

- Komplexní sada kontrol umožňuje ověření správnosti testu pro každý vzorek



EUROIMMUN EUROArray System

- Komplexní sada kontrol umožňuje ověření správnosti testu pro každý vzorek

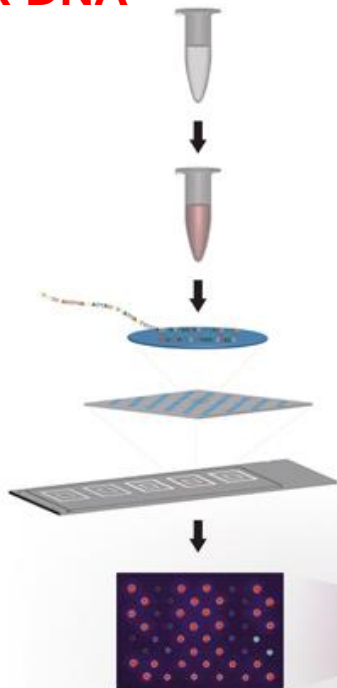


Přehled

- EUROArray System
- **Princip provedení testu**
- Přehled dostupných kitů
- EUROArray HLA-DQ2/DQ8 Direct
- EUROArray HLA-B27 Direct
- EUROArray ApoE
- Shrnutí

Provedení testu – „workflow“

vzorek DNA



PCR reakce

Hybridizace

Skenování, automatické
vyhodnocení
a interpretace výsledků



EUROArray Direct

➤ Analýza vzorku přímo z plné krve



izolace DNA



vzorek DNA



EUROArray Direct



Nucleospin blood kit
(Macherey-Nagel)

Extrakce pomocí reagentů
„Extraction solution“ 1 a 2, které
jsou součástí „direct“ kitů

< 20 min / 40 vzorků

=>

< 30 vteřin / vzorek

žádné další výdaje

EUROArray Direct

➤ Analýza vzorku přímo z plné krve

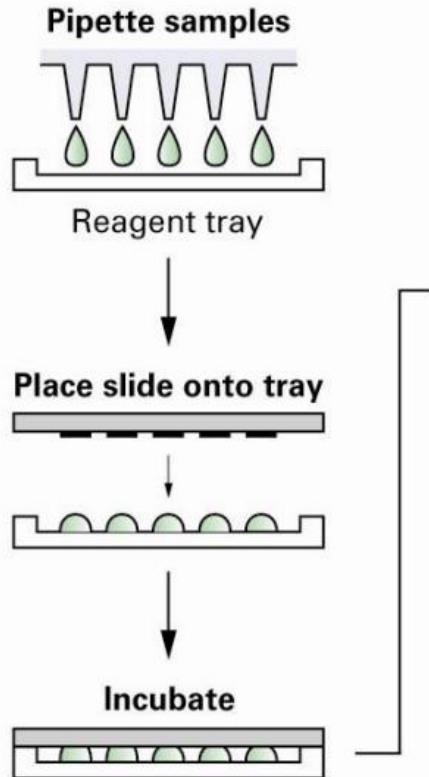


PCR

- „ready to use“ PCR reagents
- Validace na nejpoužívanější cyklery



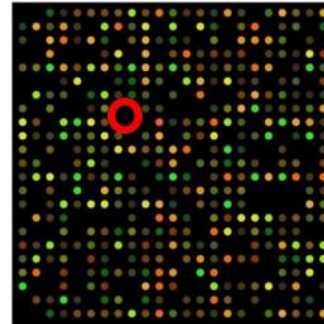
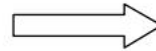
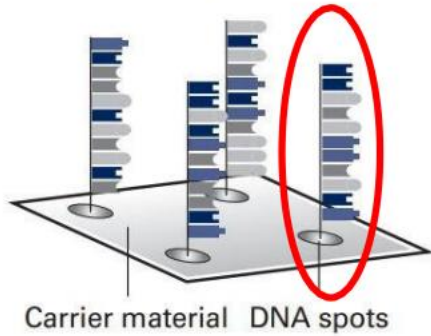
Hybridizace



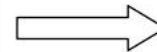
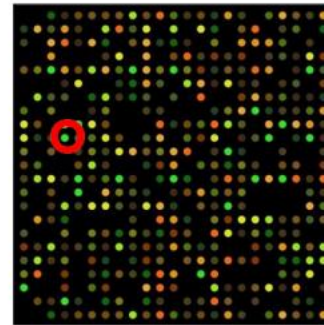
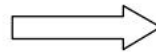
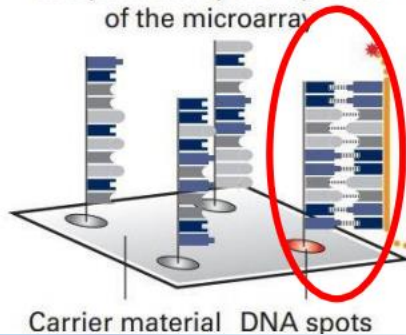
- Standardizovaná inkubace využívající prověřenou technologii „TITERPLANE“

Hybridize

No binding without complementary PCR products



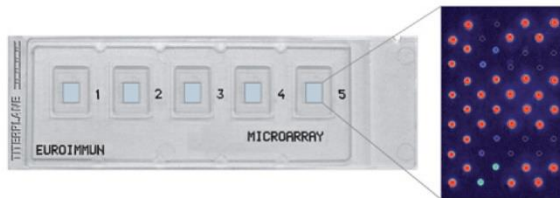
Binding of PCR products to complementary DNA probes of the microarray



Skenování, analýza dat, interpretace

Patient ID : UKSH51
 Result from : 03.02.2017
 Lot : I170127AB

Test : HLA-DQ2/DQ8-h Direct
 Protocol : 170203DK_Zö hom_EP UKSH #49-#82
 Print date : 09.02.2017 14:05:04
 Page : 1

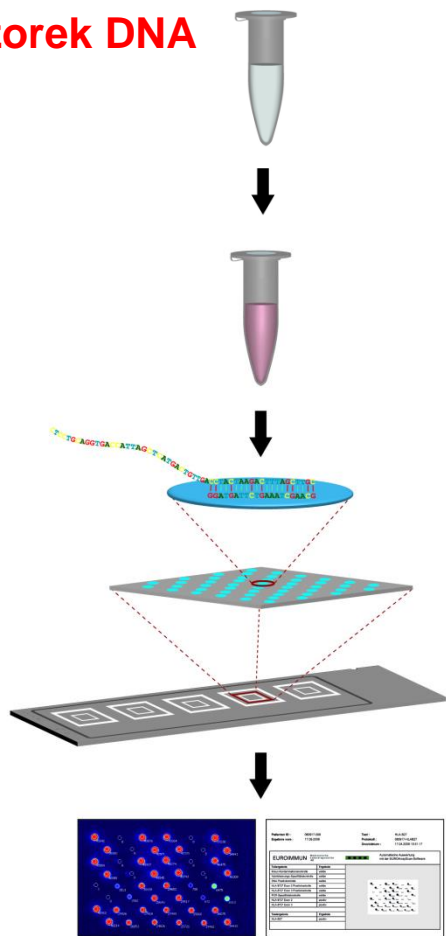


EUROIMMUN <small>Medizinische Labordiagnostika AG</small>		Automatic evaluation with the EUROArrayScan software																																								
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Partial result</th> <th>Result</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Cross contamination control</td><td>valid</td></tr> <tr><td>Hybridisation specificity control</td><td>valid</td></tr> <tr><td>DQA1*02</td><td>negative</td></tr> <tr><td>DQA1*03</td><td>negative</td></tr> <tr><td>DQA1*05</td><td>positive</td></tr> <tr><td>DQA1*01/*04/*06</td><td>positive</td></tr> <tr><td>DQA1*02/*03:01</td><td>negative</td></tr> <tr><td>DQA1*03:02/03</td><td>negative</td></tr> <tr><td>DQB1*02-I</td><td>positive</td></tr> <tr><td>DQB1*03:02</td><td>negative</td></tr> <tr><td>DQB1*02-II</td><td>positive</td></tr> <tr><td>DQB1*03/*06</td><td>negative</td></tr> <tr><td>DQB1*04</td><td>positive</td></tr> <tr><td>DQB1*05</td><td>negative</td></tr> <tr><td>α-subunit HLA-DQ2.2</td><td>negative</td></tr> <tr><td>α-subunit HLA-DQ2.5</td><td>positive</td></tr> <tr><td>α-subunit HLA-DQ8</td><td>negative</td></tr> <tr><td>β-subunit HLA-DQ2.2/DQ2.5</td><td>positive</td></tr> <tr><td>β-subunit HLA-DQ8</td><td>negative</td></tr> </tbody> </table>		Partial result	Result	Cross contamination control	valid	Hybridisation specificity control	valid	DQA1*02	negative	DQA1*03	negative	DQA1*05	positive	DQA1*01/*04/*06	positive	DQA1*02/*03:01	negative	DQA1*03:02/03	negative	DQB1*02-I	positive	DQB1*03:02	negative	DQB1*02-II	positive	DQB1*03/*06	negative	DQB1*04	positive	DQB1*05	negative	α-subunit HLA-DQ2.2	negative	α-subunit HLA-DQ2.5	positive	α-subunit HLA-DQ8	negative	β-subunit HLA-DQ2.2/DQ2.5	positive	β-subunit HLA-DQ8	negative	<p>Slide 1 Field C Chip 1</p>
Partial result	Result																																									
Cross contamination control	valid																																									
Hybridisation specificity control	valid																																									
DQA1*02	negative																																									
DQA1*03	negative																																									
DQA1*05	positive																																									
DQA1*01/*04/*06	positive																																									
DQA1*02/*03:01	negative																																									
DQA1*03:02/03	negative																																									
DQB1*02-I	positive																																									
DQB1*03:02	negative																																									
DQB1*02-II	positive																																									
DQB1*03/*06	negative																																									
DQB1*04	positive																																									
DQB1*05	negative																																									
α-subunit HLA-DQ2.2	negative																																									
α-subunit HLA-DQ2.5	positive																																									
α-subunit HLA-DQ8	negative																																									
β-subunit HLA-DQ2.2/DQ2.5	positive																																									
β-subunit HLA-DQ8	negative																																									
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Test result</th> <th>Result</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>HLA-DQ2.2</td><td>negative</td></tr> <tr><td>HLA-DQ2.5</td><td>positive, heterozygous</td></tr> <tr><td>HLA-DQ8</td><td>negative</td></tr> <tr><td>β-subunit HLA-DQ2.2/DQ2.5</td><td>positive, heterozygous</td></tr> </tbody> </table>		Test result	Result	HLA-DQ2.2	negative	HLA-DQ2.5	positive, heterozygous	HLA-DQ8	negative	β-subunit HLA-DQ2.2/DQ2.5	positive, heterozygous																															
Test result	Result																																									
HLA-DQ2.2	negative																																									
HLA-DQ2.5	positive, heterozygous																																									
HLA-DQ8	negative																																									
β-subunit HLA-DQ2.2/DQ2.5	positive, heterozygous																																									

Signature : _____

Celková doba

vzorek DNA



Pracovní čas
(40 vzorků)

< 10 min

< 20 min

< 10 min

< 40 min
< 1 min / vzorek

(bez izolace)

Čas celkem
(včetně inkubace)

≈ 60 min

≈ 80 min

≈ 10 min

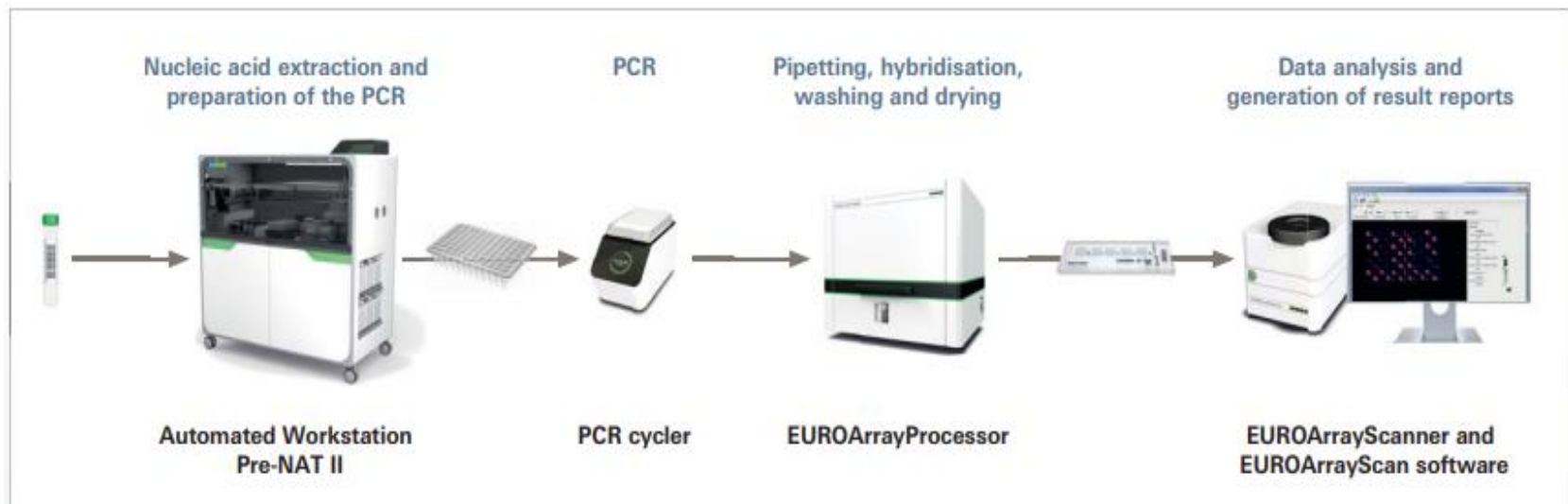
≈ 2 h 30 min

PCR

**Hybridizace
vč. promývání**

**Skenování
a vyhodnocení**

Možnost automatizace



Přehled

- EUROArray System
- Princip provedení testu
- **Přehled dostupných kitů**
- EUROArray HLA-DQ2/DQ8 Direct
- EUROArray HLA-B27 Direct
- EUROArray ApoE
- Shrnutí

EUROArray - portfolio

genetické

Produkt	Indikace	Katalogové číslo
HLA-DQ2/DQ8-h Direct HLA-DQ2/DQ8 Direct	Celiakie	MN 5320-####-V MN 5321-####-V
HLA-B27 Direct	Ankylozující spondylitida	MN 5110-####-V
HLA-B57:01 Direct	Přecitlivělost na Abacavir	MN 5210-####-V
HLA-Cw6 Direct	Lupénka	MN 5410-####
HLA-DRB1 sdílený epitop - RUO	Revmatoidní artritida	MN 5150-####
Laktózová/fruktózová intolerance Direct	Laktózová/fruktózová intol.	MN 5350-####/V
FII+/FV/MTHFR Direct	Trombózy	MN 5820-####-V
HFE Direct (2 nebo 4 SNP)	Hemochromatóza	MN 55##-####-V
APOE Direct	Alzheimerova choroba	MN 5710-####-V
PneuVir (17 typů včetně SARS-CoV-2)	Respirační viry	MN 2821-####-1

infekční

Produkt	Indikace	Katalogové číslo
HPV (30 HPV; low-, high risk)	Lidský papillomavirus	MN 2540-####
HSV1/2 VZV	Herpes infekce	MN 2530-####-1
STI (až 11 patogenů na 1 čipu)	Sexuálně přenos. choroby	MN 2830-####-#
Dermatomykózy (50 dermatofyt, 6 kvasinek/vl.hub)	Infekční onemocnění kůže	MN 2850-####

Přehled

- EUROArray System
- Princip provedení testu
- Přehled dostupných kitů
- **EUROArray HLA-DQ2/DQ8 Direct**
- EUROArray HLA-B27 Direct
- EUROArray ApoE
- Shrnutí

EUROArray HLA-DQ2/DQ8

Celiakie

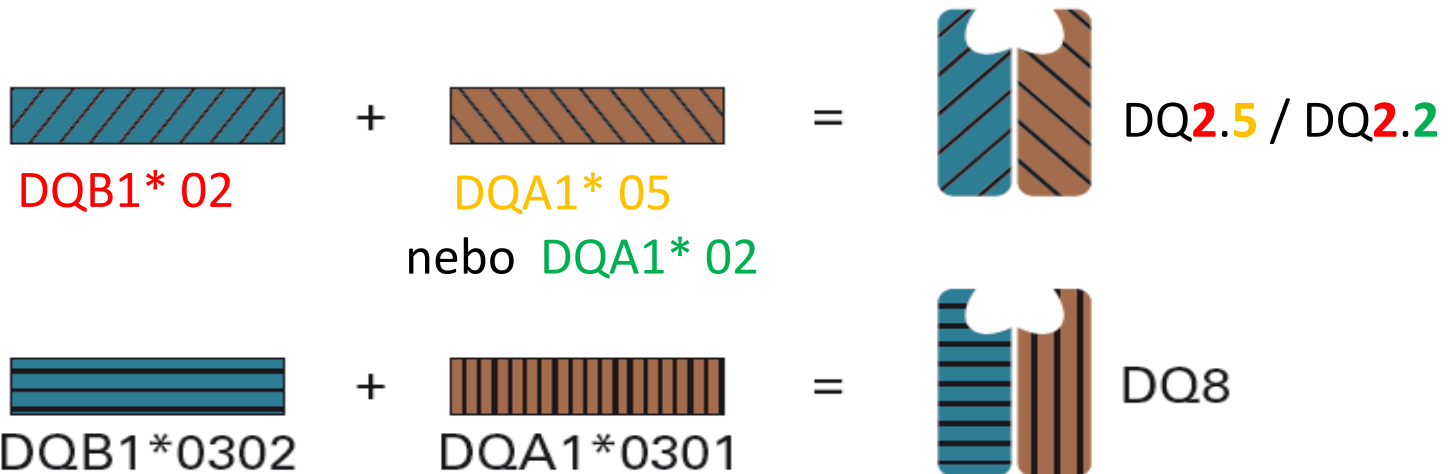
- Chronické onemocnění sliznice tenkého střeva způsobené nesnášenlivostí lepku
- Asociováno s HLA molekulami II. třídy DQ2 a DQ8

Parametr	Výskyt	
	Populace	Pacienti s celiakií
HLA-DQ2/DQ8	~20-40%	~99%

- **Velmi vysoká negativní prediktivní hodnota ($\approx 100\%$)**

EUROArray HLA-DQ2/DQ8

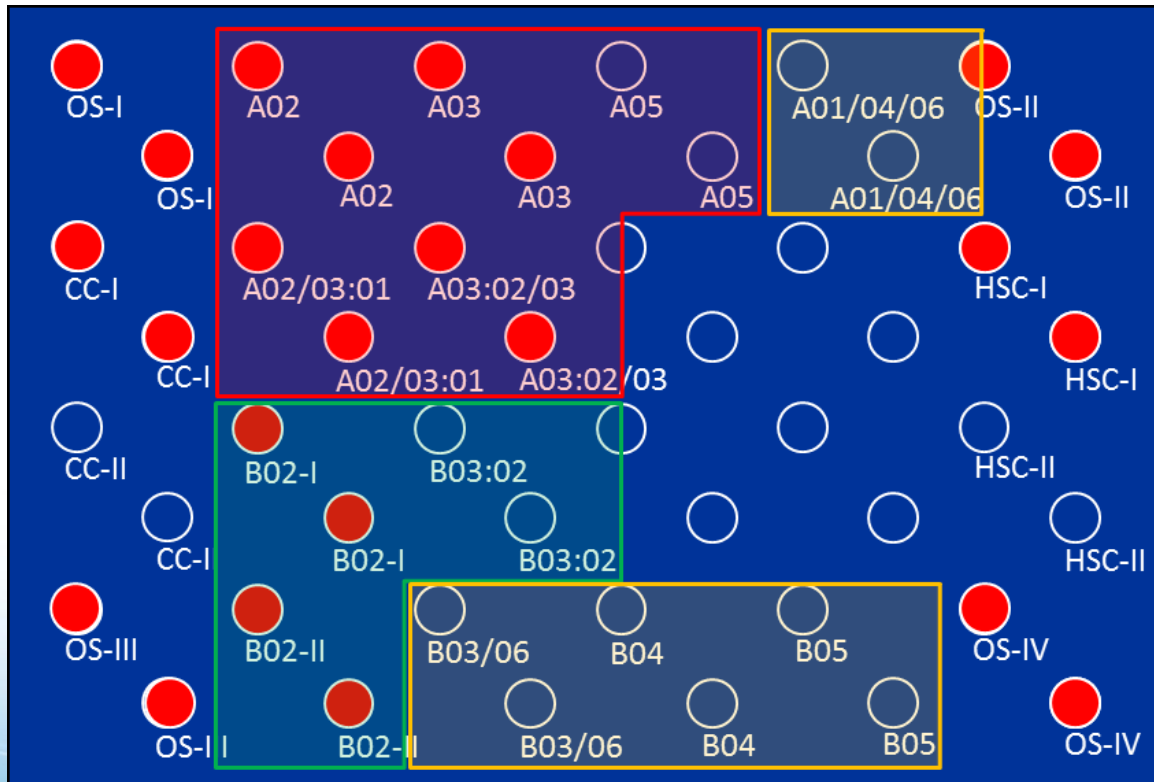
- **HLA-DQ2 a HLA-DQ8** - heterodimery skládající se z α a β podjednotek
- Detekce pomocí následujících genů:



EUROArray HLA-DQ2/DQ8-h Direct

Alely detekující
DQ α -podjednotky

Nové:Non-CD asociované
alely DQ α -podjednotek



Alely detekující
DQ β -podjednotky

Nové:Non-CD
asociované alely
DQ β -podjednotek

EUROArray HLA-DQ2/DQ8

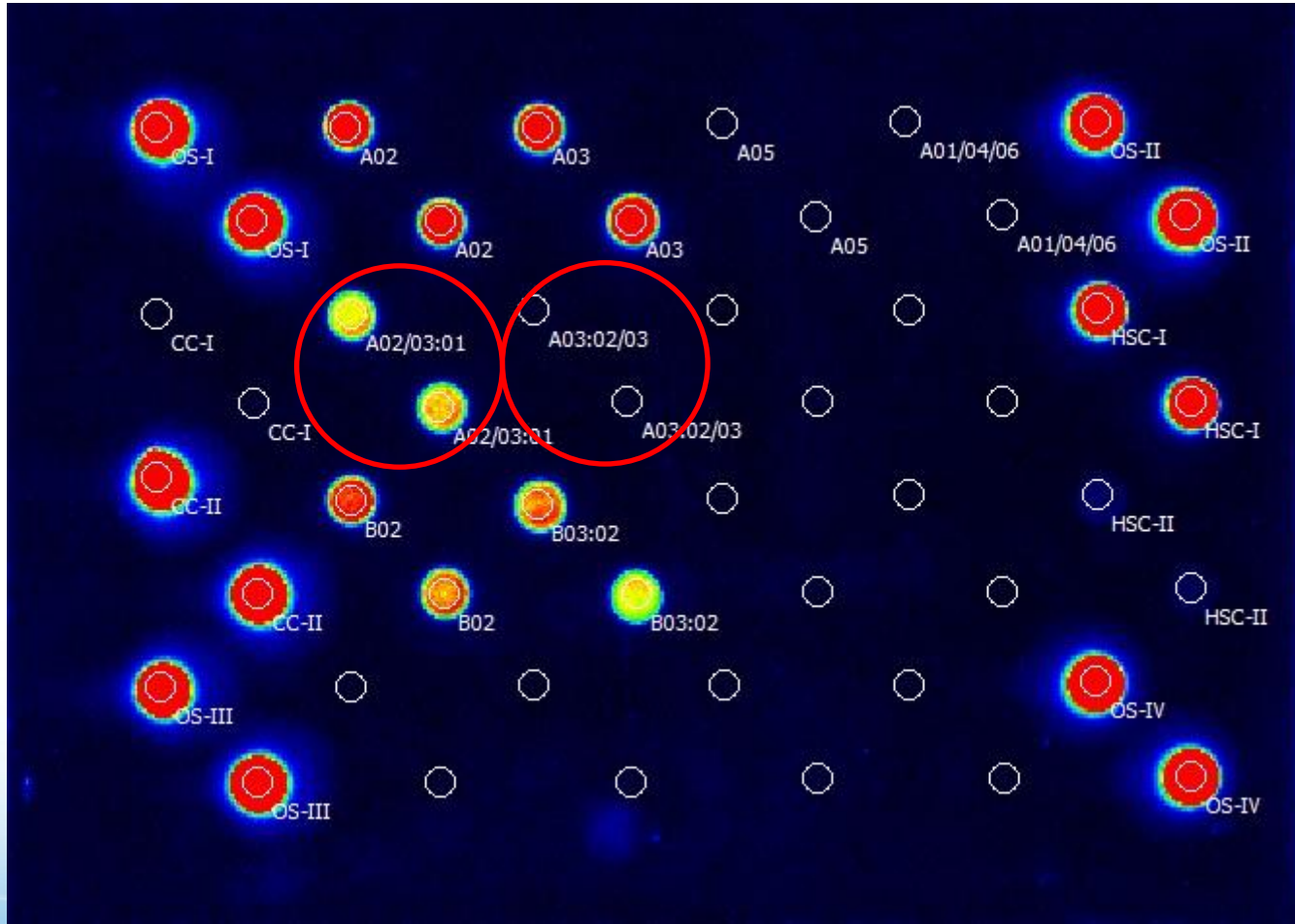
➤ Alelické a funkční skupiny alel HLA asociovaných s celiakií

Alelická skupina	Funkční skupina (P-group)	Běžné alely	Vzácné alely
DQA1*02	NEDEFINOVÁNO	DQA1*02:01	
DQA1*03	DQA1*03:01P	DQA1*03:01 DQA1*03:02 DQA1*03:03	
DQA1*05	DQA1*05:01P	DQA1*05:01 DQA1*05:03 DQA1*05:05 DQA1*05:08 DQA1*05:09	DQA1*05:07 DQA1*05:11
	NEDEFINOVÁNO	DQA1*05:02	DQA1*05:04 DQA1*05:10

ESPGHAN guidelines: DQB1*03:02 + DQA1*03:01 = DQ8

- Dle řady studií zabývajících se asociací HLA – DQ molekul s celiakií se ukazuje, že alfa podjednotka haplotypu DQ8 může být tvořena jakoukoliv alelou patřící do funkční skupiny DQA1*03:01P

EUROArray HLA-DQ2/DQ8



DQ2.2 pozitivní
DQ2.5 negativní
DQ8 pozitivní

DQB1*03:02+**DQA1*03:01** = DQ8 (ESPGHAN)

DQB1*03:02+**DQA1*03:02/03** = DQ8 (Rozšířená definice)

EUROArray HLA-DQ2/DQ8-h Direct

- Detekce alel, které nejsou asociované s celiakií umožňuje rozlišit mezi homozygotním a heterozygotním genotypem pro DQ2.2 a DQ2.5 heterodimery
- **Zvýšená prediktivní hodnota rozvoje celiakie:**
 - u homozygotů je 2-5x vyšší riziko rozvoje onemocnění ve srovnání s heterozygoty

Přehled

- EUROArray System
- Princip provedení testu
- Přehled dostupných kitů
- EUROArray HLA-DQ2/DQ8 Direct
- **EUROArray HLA-B27 Direct**
- EUROArray ApoE
- Shrnutí

EUROArray HLA-B27

HLA-B*27

- Součást MHC komplexu - HLA I. třídy (chromozom 6)
- Nalezeno zatím 132 alel od HLA-B*27:01 po HLA-B*27:106, kde HLA-B*27:22 je sekvenační chyba (= HLA-B*27:06)
- Asociace s ankylozující spondylitidou a dalšími spondyloartritidami

Parametr	Relativní frekvence		
	Populace	Pacienti s ankylozující spondylitidou	Pacienti s jinými spondyloartritidami
HLA-B27	~ 10 %	~ 90 %	40 – 70 %

EUROArray HLA-B27

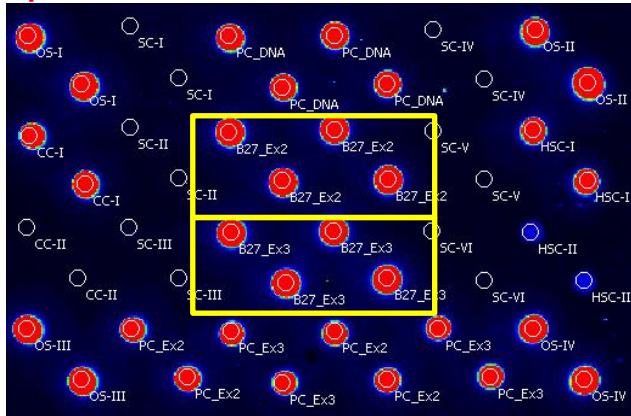
Výhody EUROArray HLA-B27 kitu:

- Detekuje všechny HLA-B*27 alely (exon 2, exon 3, nebo obojí)
- Upozorní na možný výskyt HLA-B*27:06 a -B*27:09 subtypů, které nejsou asociované s ankylozující spondylitidou (běžné subtypy v jihovýchodní Asii a Itálii (Sardinie))
(žádný PCR produkt v exonu 3 s HLA-B*27:06 a -B*27:09)

→ zvýšená specificita diagnózy: ankylozující spondylitida

EUROArray HLA-B27

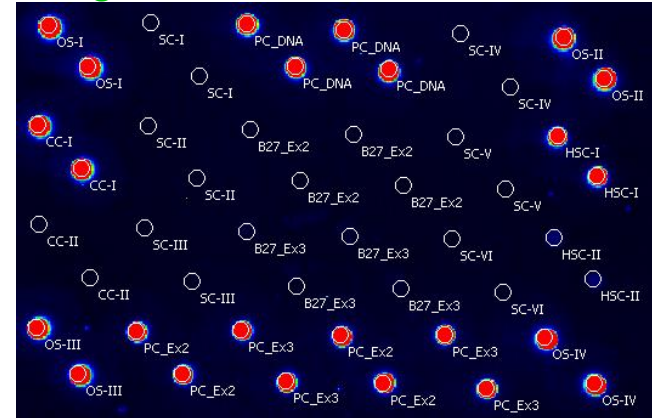
pozitivní



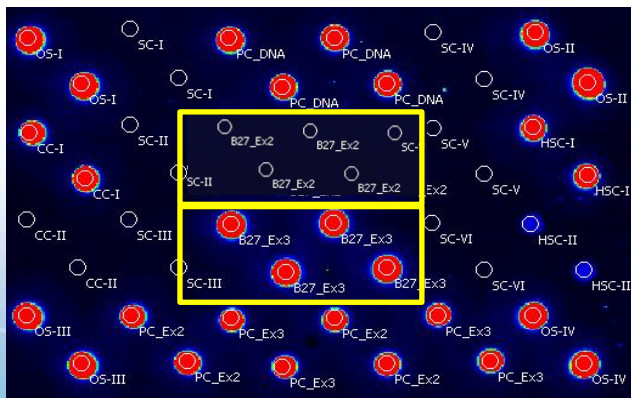
Exon 2

Exon 3

negativní



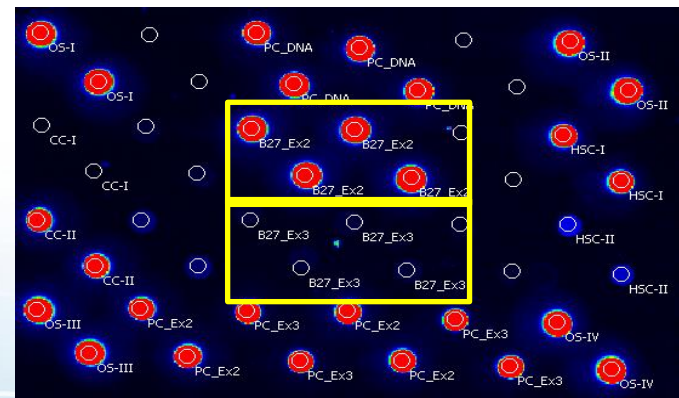
pozitivní



Exon 2

Exon 3

pozitivní, ale s možným výskytem
HLA-B*27:06 nebo HLA-B*27:09



Přehled

- EUROArray System
- Princip provedení testu
- Přehled dostupných kitů
- EUROArray HLA-DQ2/DQ8 Direct
- EUROArray HLA-B27 Direct
- **EUROArray ApoE**
- Shrnutí

EUROArray ApoE

- ApoE je cholesterol transportující protein vyskytující se ve 3 izoformách označovaných jako E2, E3 a E4 (3 varianty alel $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ a $\epsilon 4$)
- Izoformy se liší složením aminokyselin na pozicích 112 a 158

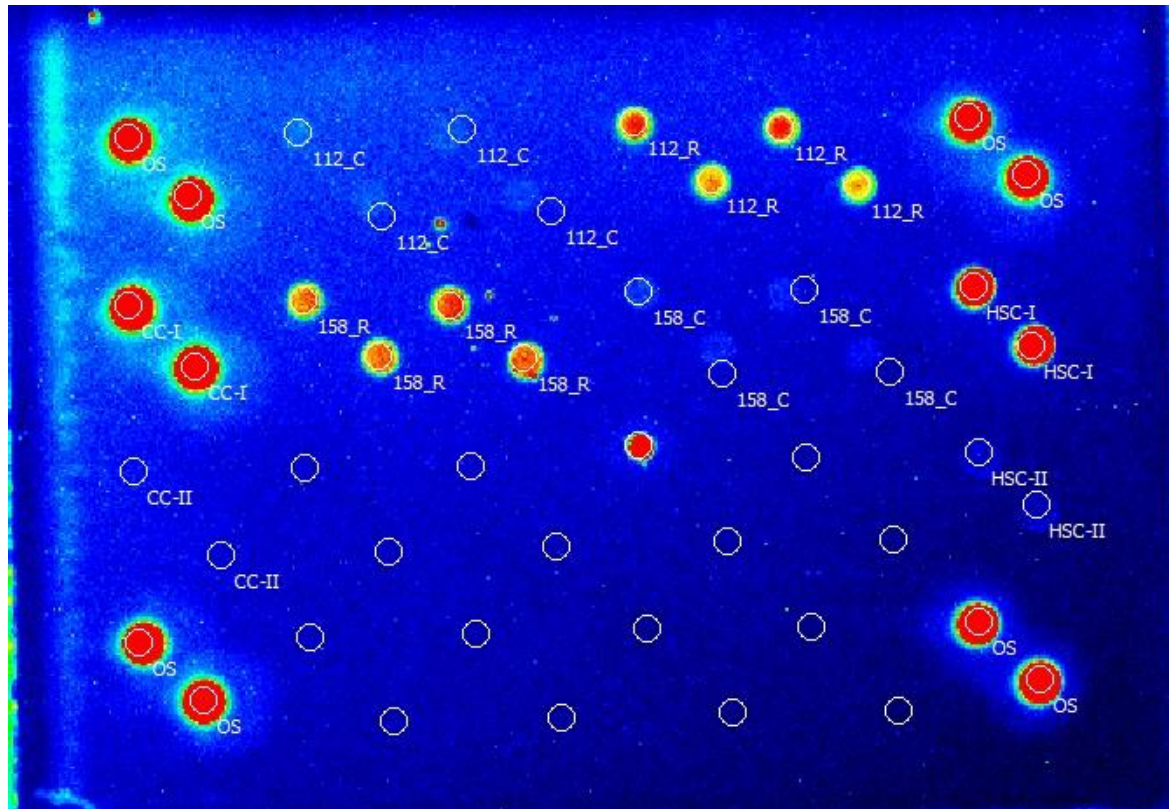
ApoE Genotyp	Báze na odpovídající pozici (C=Cytosine, T=Thymine)		Aminokyselina (C= Cystein, R=Arginin)	
	334T>C	472C>T	APOE pozice 112	APOE pozice 158
$\epsilon 3/\epsilon 3$	T/T	C/C	C/C (WT homozygot)	R/R (WT homozygot)
$\epsilon 2/\epsilon 2$	T/T	T/T	C/C (WT homozygot)	C/C (M homozygot)
$\epsilon 4/\epsilon 4$	C/C	C/C	R/R (M homozygot)	R/R (WT homozygot)

- **Relativní riziko vývoje Alzheimerovy choroby v porovnání s $\epsilon 3/\epsilon 3$ nositeli**

$\epsilon 2/\epsilon 2$	$\epsilon 2/\epsilon 3$	$\epsilon 2/\epsilon 4$	$\epsilon 3/\epsilon 3$	$\epsilon 2/\epsilon 4$	$\epsilon 4/\epsilon 4$
<0,1 x	<0,1 x	2x	1x	3	5-8 x

- $\epsilon 2$ chrání před ACH, spojován s dlouhověkostí
- 10-20% homozygotů $\epsilon 2/\epsilon 2$ má hyperlipoproteinémii III. typu - riziko předčasné manifestace aterosklerózy

EUROArray ApoE



Patient ID: 1

APOE

$\epsilon 4/\epsilon 4$

Cross contamination control
valid

Hybridisation specificity control
valid

APOE C112R
R / R (mutation homozygous)

APOE R158C
R / R (wild type homozygous)

- Relativní riziko vývoje Alzheimerovy choroby v porovnání s $\epsilon 3/\epsilon 3$ nositeli

$\epsilon 2/\epsilon 2$	$\epsilon 2/\epsilon 3$	$\epsilon 2/\epsilon 4$	$\epsilon 3/\epsilon 3$	$\epsilon 2/\epsilon 4$	$\epsilon 4/\epsilon 4$
<0,1 x	<0,1 x	2x	1x	3	5-8 x

Přehled

- EUROArray System
- Princip provedení testu
- Přehled dostupných kitů
- EUROArray HLA-DQ2/DQ8 Direct
- EUROArray HLA-B27 Direct
- EUROArray ApoE
- **Shrnutí**

Shrnutí

- „ready to use“ PCR komponenty
- CE-IVD certifikace, IVD-R certifikace v blízké době
- Plně automatické, standardizované vyhodnocení a interpretace výsledků
- Možnost elektronické archivace dat
- Připojení na LIS
- Žádné další náklady na izolaci s „Direct“ kity
- Množství integrovaných kontrol zajišťujících správnost výsledku
- Doposud 100% úspěšnost v EHK (HLA-DQ2/DQ8, HLA-B27, FII+/FV)
- Pružná komunikace se společností EUROIMMUN ☺

Děkuji za pozornost.