



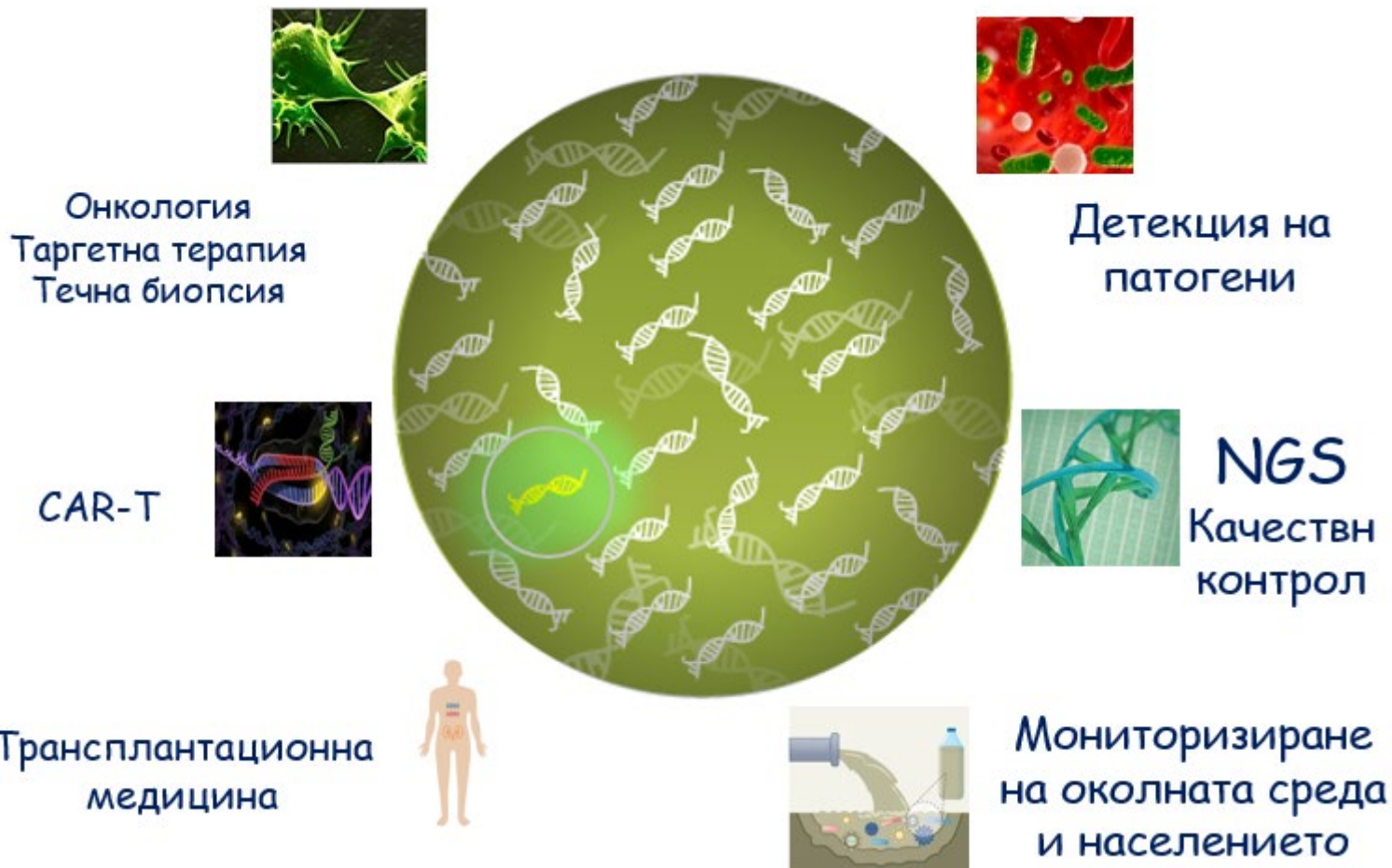
Мястото на дигиталният PCR в съвременната клинична лаборатория

**Petar Podlesniy, Ph.D. Associate Professor
Institute of Biomedical Research of Barcelona**



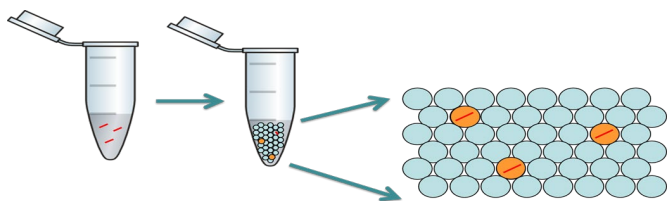
Научна среща на Софийският клон на Българското Дружество по Клинична Лаборатория,
съвместно с ДиаХем ООД, официален представител за България на фирма Bio-Rad,
26-ти Март 2026 г. София

Детекция и измерване на ДНК и РНК

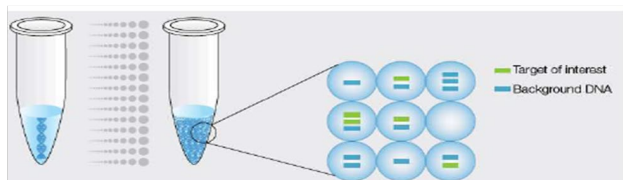


Предимства на дигиталния PCR

➤ ddPCR е с подобрена прецизност, чувствителност и възпроизводимост



- Крайна точка (end-point) PCR (0 или 1);
- Не зависи от стандарти
- Лесен за анализ и интерпретация
- Толерантност към PCR инхибитори



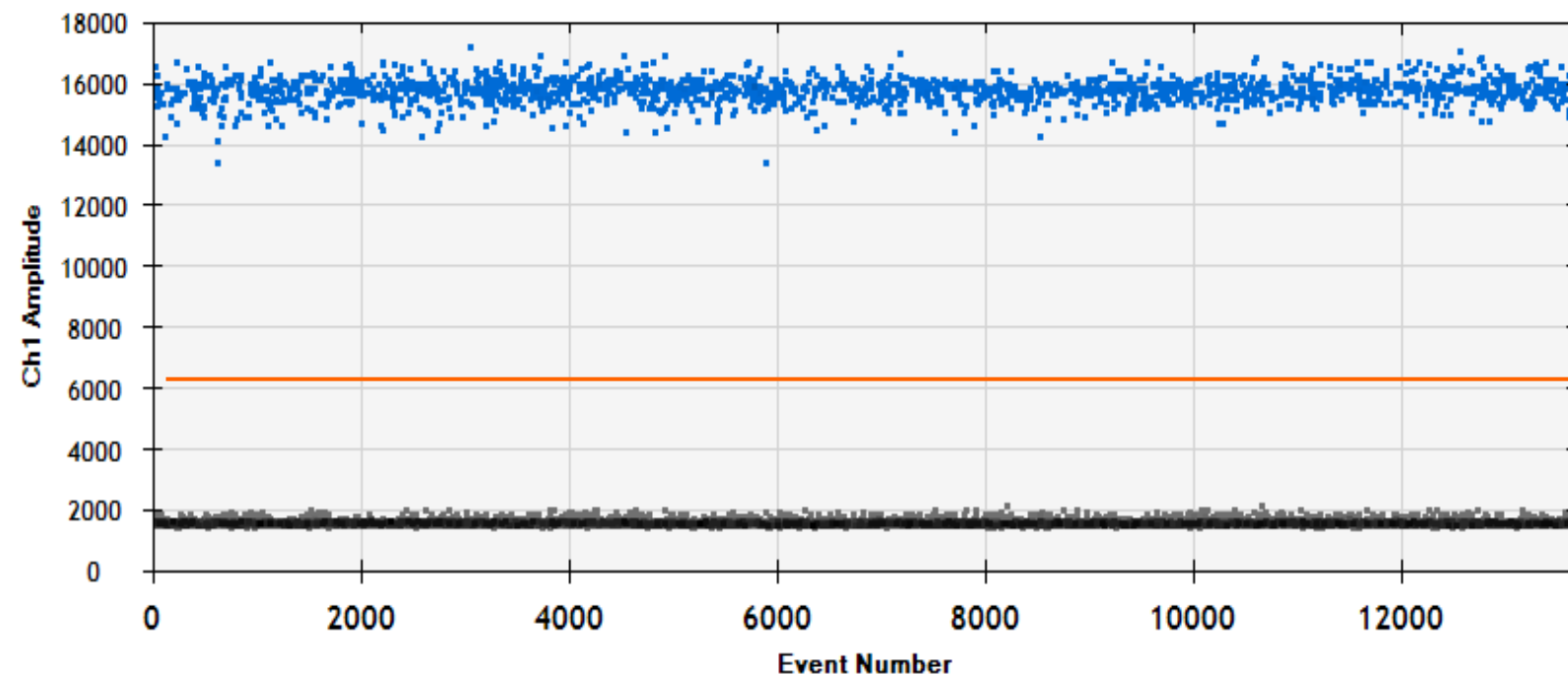
➤ Използва се за трудни приложения

- Измерване на малки разлики на ДНК таргети между пробите
- Измерване и детекция на много ниски концентрации и с голяма специфичност при сходни таргети

Автоматизиран анализ на данните

Позитивни дроплети съдържат поне едно копие таргетна ДНК

Ch1 - CNV:0.95 Pos:1787 Neg:11894

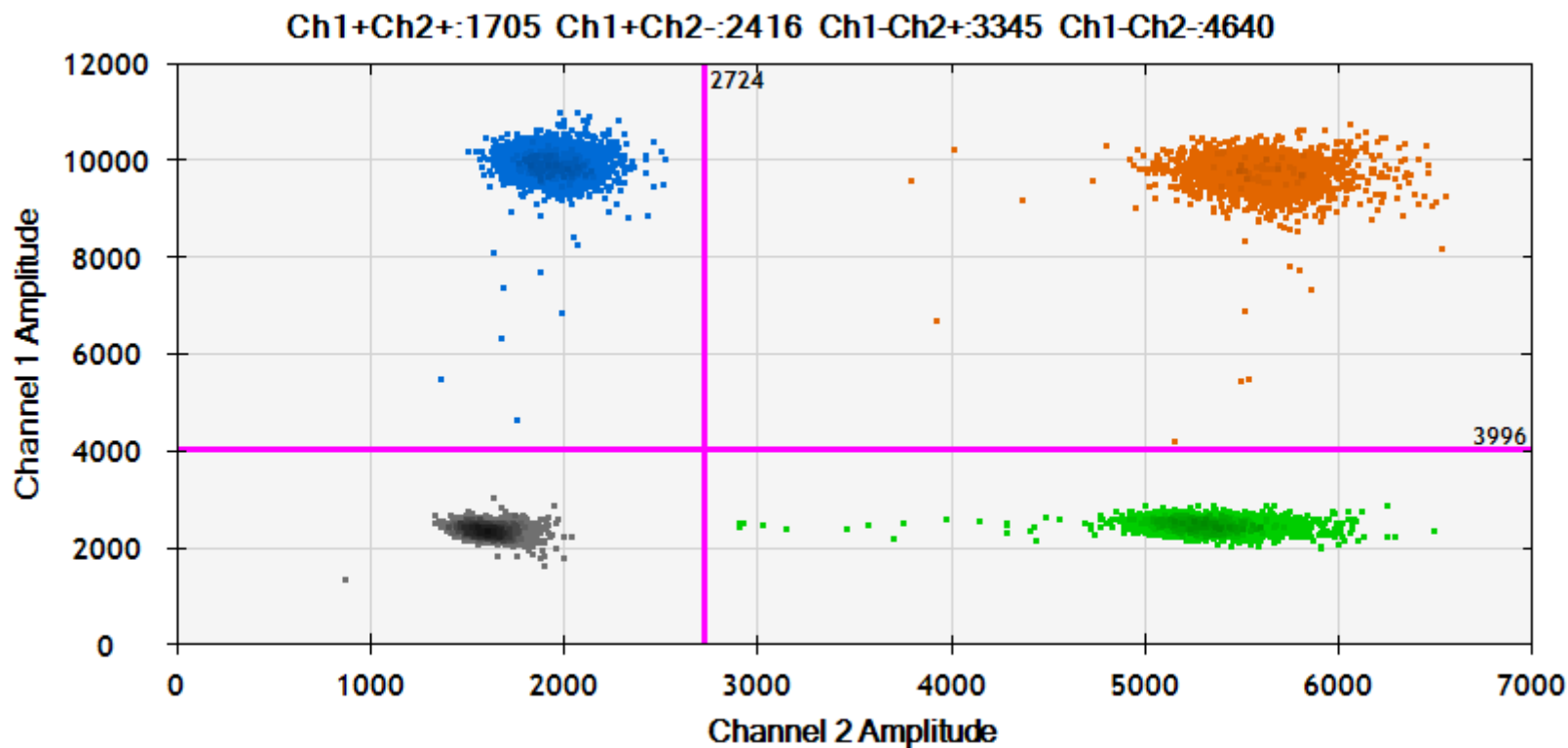


Позитивни
капки

Прагова линия

Негативни
капки

Едновременна детекция на два таргета-мультиплекс



Двуизмерна 2D графика на едновременна детекция на два таргета, една във FAM и една в HEX.



Нови приложения на ddPCR в онкологията

1. Детекция на мутации с ниска честота в клинични (деградирани) проби

- Sanger 20%, NGS 1-5% и ddPCR <0.01%
- FFPE, цсДНК

2. Промени в брой соматични копия

-валидиране или допълване на данни от array comparative genomic hybridization (aCGH), FISH, NGS;

3. Течна биопсия

- циркулираща туморна ДНК (цтДНК)
- циркулиращи туморни клетки (ЦТК)

4. Епигенетични тествания

5. Регенеративна медицина

Чувствителността на ddPCR се използва за характеризиране на стволови клетки и за създаване на пациент-съвместими стволови клетки за персонализирани

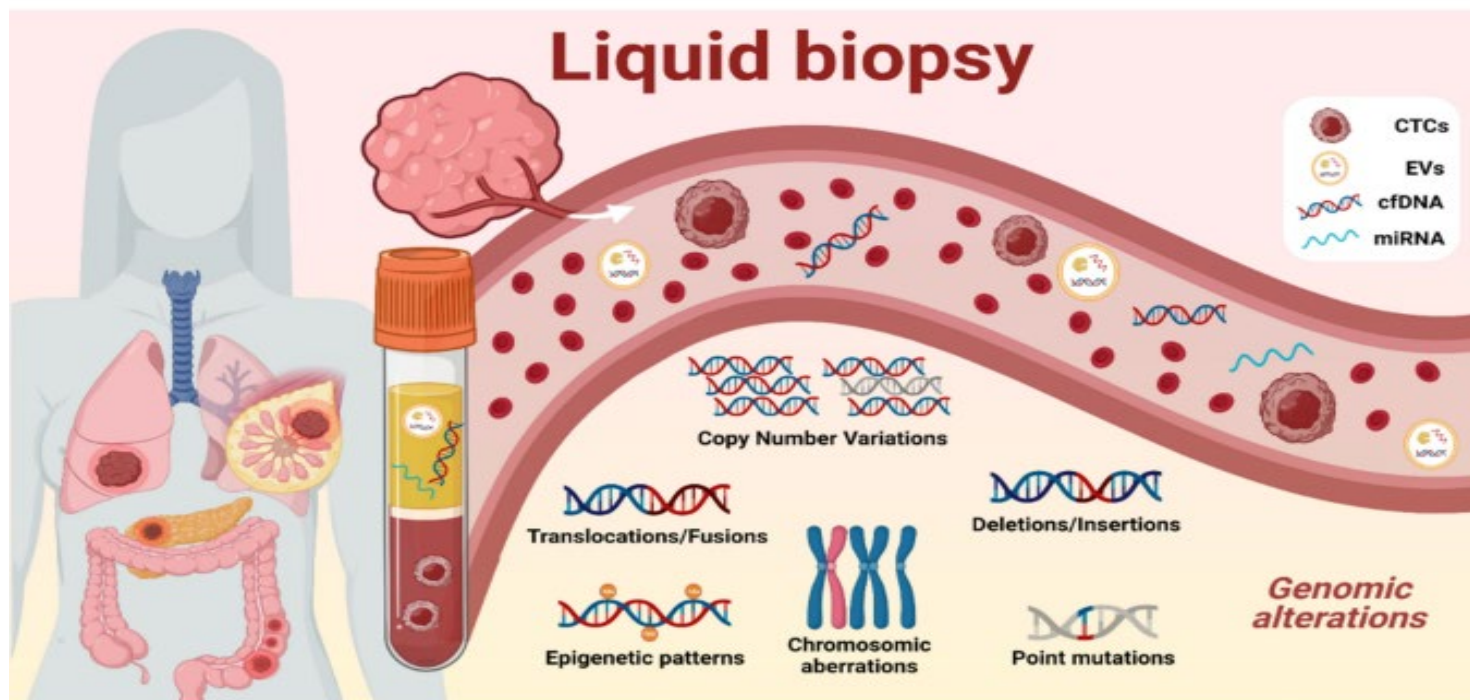
Таргетни терапии

Table 5. An overview of the ongoing clinical trials in which the ddPCR technique is used for actionable biomarker detection.

Disease.	Identifier	Aims	State	Number of Patients
NSCLC	NCT04720339	cfDNA quantification	Recruiting	250
	NCT02418234	<i>EGFR</i> T790M monitoring	Completed	314
	NCT02778854	Driver mutation detection	Recruiting	200
	NCT02279004	<i>BRAF</i> , <i>KRAS</i> , and <i>EGFR</i> mutation detection	Recruiting	680 *
	NCT03771404	Study genetic alteration during the follow-up	Recruiting	50
	NCT03265496	<i>EGFR</i> detection in solid and liquid biopsies	Active, not recruiting	117
	NCT03706625	Biomarker discovery in ctDNA and CTCs	Recruiting	170 *
	NCT03865511	<i>EGFR</i> in ctDNA	Recruiting	150
	NCT04814407	Immune-methylated signature identification	Recruiting	900
	NCT01930474	<i>EGFR</i> and <i>ALK</i>	Unknown	200
Advanced NSCLC	NCT03309462	<i>EGFR</i> in tissue and plasma	Completed	50
	NCT02282267	<i>EGFR</i> in plasma cfDNA	Unknown	188
	NCT02511288	Genetic profile ctDNA	Recruiting	900
	NCT02997501	<i>EGFR</i> T790M comparison between COBAS, ddPCR and NGS	Completed	167
	NCT04912687	<i>EGFR</i> mutation	Not yet recruiting	580
SCC Lung	NCT03938012	<i>MET</i> N375S, TP53	Recruiting	80
	NCT02913430	<i>ESR1</i> mutation	Active, not recruiting	7
mBC	NCT04720729	Chemotherapy monitoring ctDNA <i>HER2</i>	Recruiting	214
	NCT04480814	<i>PIK3CA</i> in ER+/ <i>HER2</i>	Recruiting	120
	NCT03947736	ctDNA <i>HER2</i> amplification	Recruiting	200
	NCT03829306	Mechanism of Kadcyla resistance	Recruiting	50
	NCT03357120	ctDNA after neoadjuvant chemotherapy	Recruiting	180
	NCT02473120	<i>ESR1</i> mutations	Completed	104
mCRC	NCT02994888	ctDNA for cetuximab monitoring	Completed	47
	NCT03832621	<i>MGMT</i> methylation	Active	135
	NCT04554836	<i>RAS</i> mutation monitoring	Recruiting	144
	NCT03227926	<i>RAS</i> mutation monitoring	Recruiting	129
CRC	NCT04050345	<i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> , <i>BRAF</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>TP53</i> and <i>APC</i> detection	Recruiting	1000



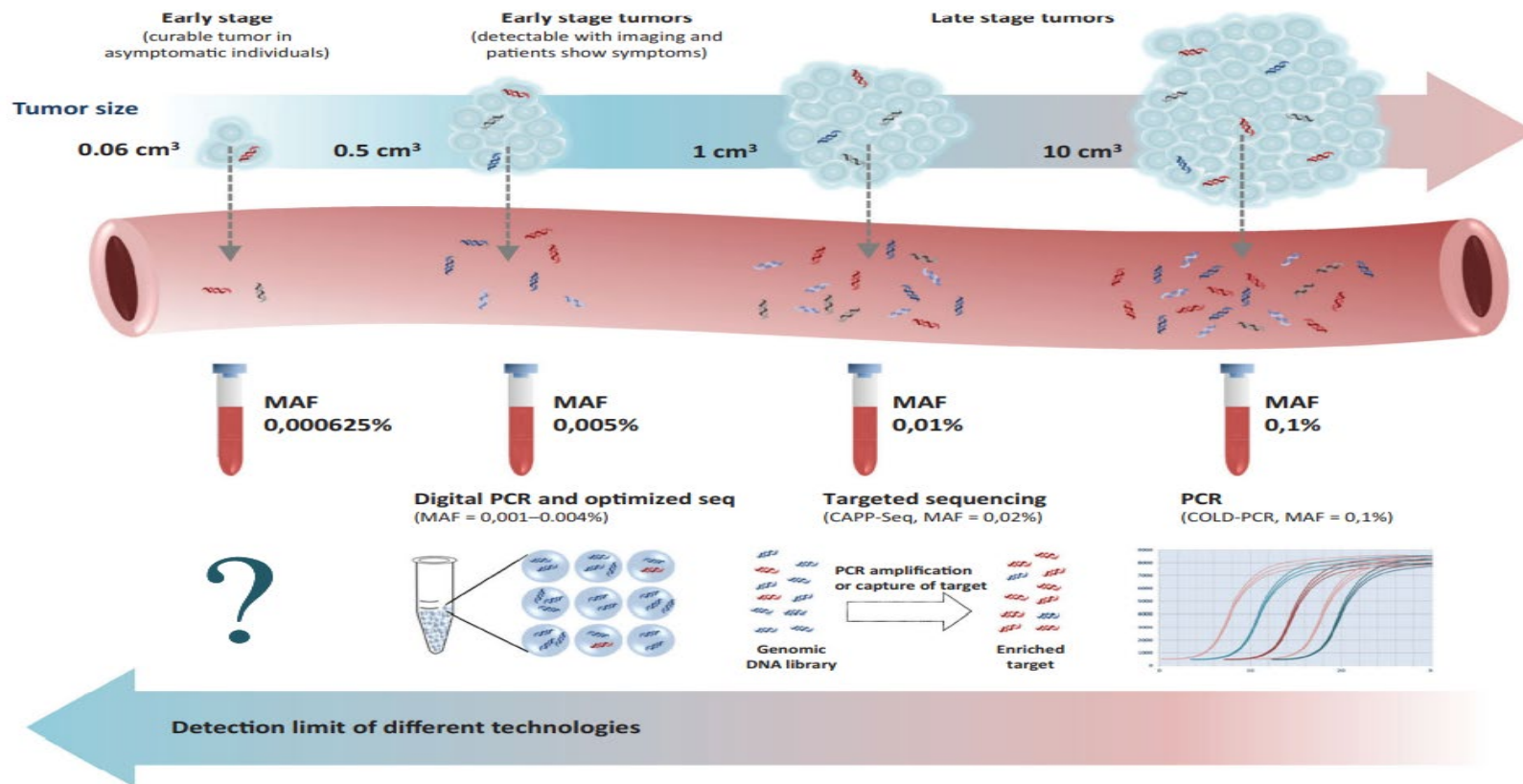
Течна биопсия



ddPCR е най-чувствителният метод за детекция на соматични мутации и един от най-добрите методи за анализи на цтДНК.

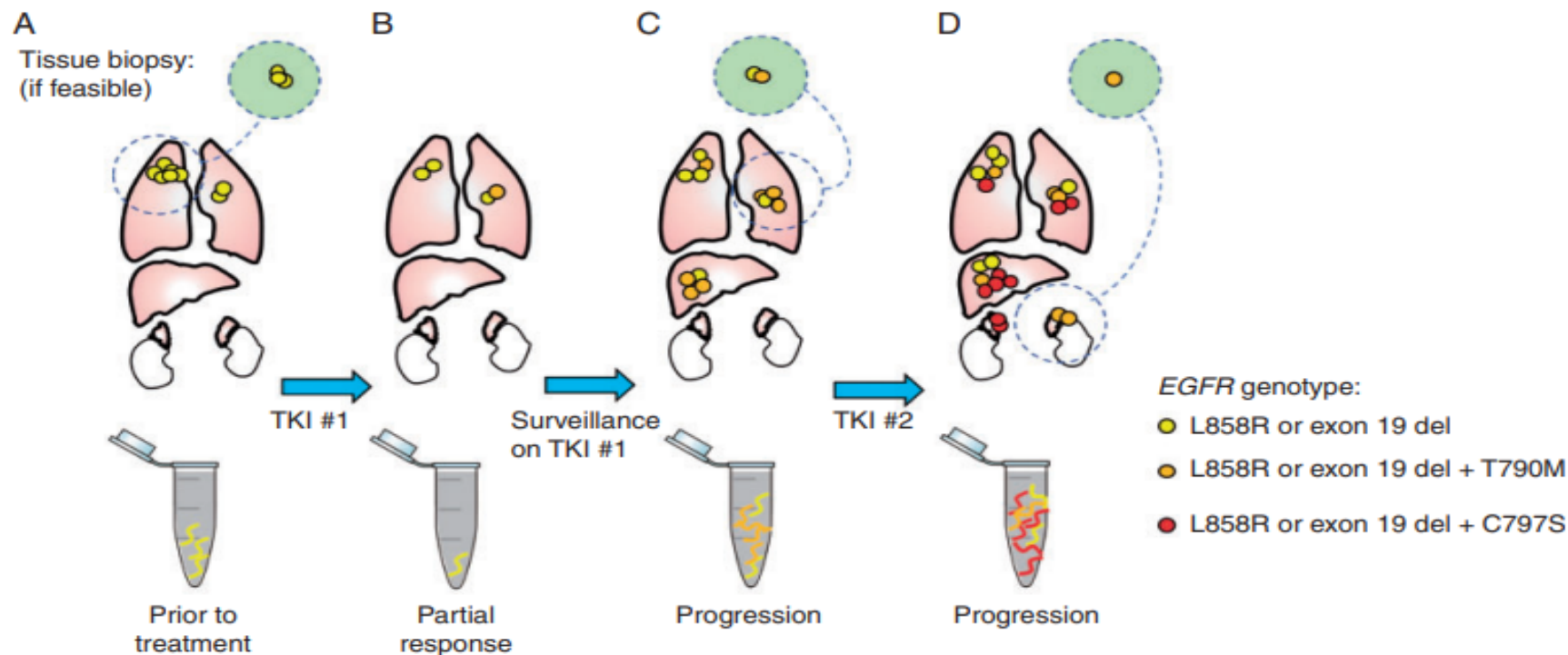


Течна биопсия



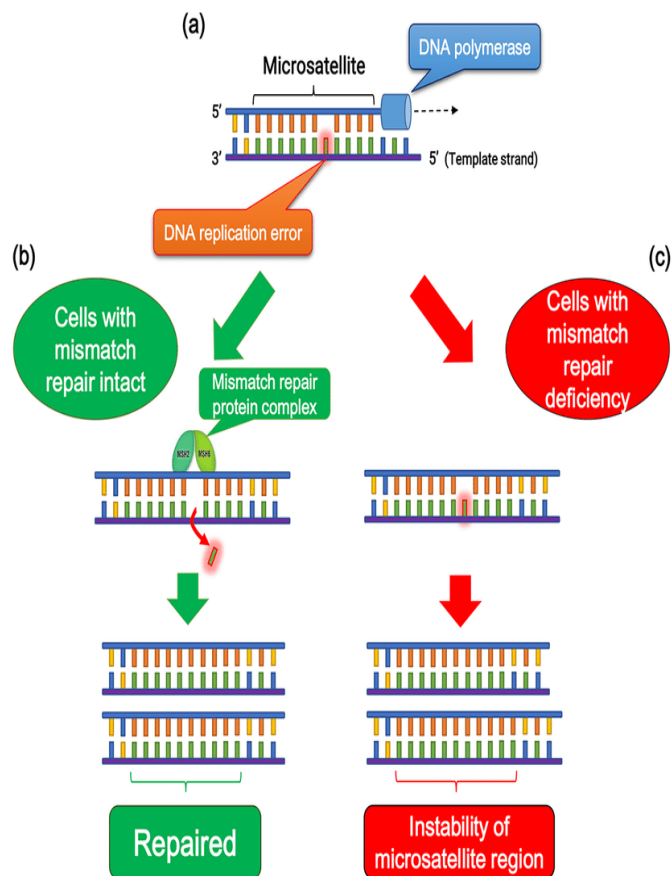
Адаптирано от: Bronkhorst, A.J., Ungerer, V., Holdenrieder, S. Early detection of cancer using circulating tumor DNA: biological, physiological and analytical considerations; *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 2019;57:4, 253-269

Течна биопсия за откриване на активирани EGFR мутации, мониторинг на отговор към терапия и детекция на резистентност към ТКИ



Адаптирано от Goldman, JW., Noor, ZS, Remon, J. et al. Are liquid biopsies a surrogate for tissue EGFR testing?; *Annals of Oncology* 29 (Supplement 1): i38-i46, 2018
doi:10.1093/annonc/mdx706 ESMO review

Микросателитна стабилност и нестабилност



10 ddPCR MSI тестът работи с ДНК от тъканни проби и с ДНК от течна биопсия.

ddPCR при хематологични неоплазии: нов молекулярен метод за прогноза и терапия

ddPCR и лимфопролиферативни неоплазии

Disease	Target	Reference
ALL	IgH BCR-ABL1	[60–63,65]
HCL	B-RAF	[79,80]
CLL	TP53 NOTCH1	[82,84,85]
WM	MYD88	[88–90]
HL	STAT6	[98]
FL	EZH2 BCL2/JH	[94,95]
MCL	BCL1/JH	[96]
MM	IgH	[99,100]

ddPCR и миелоидни разстройства

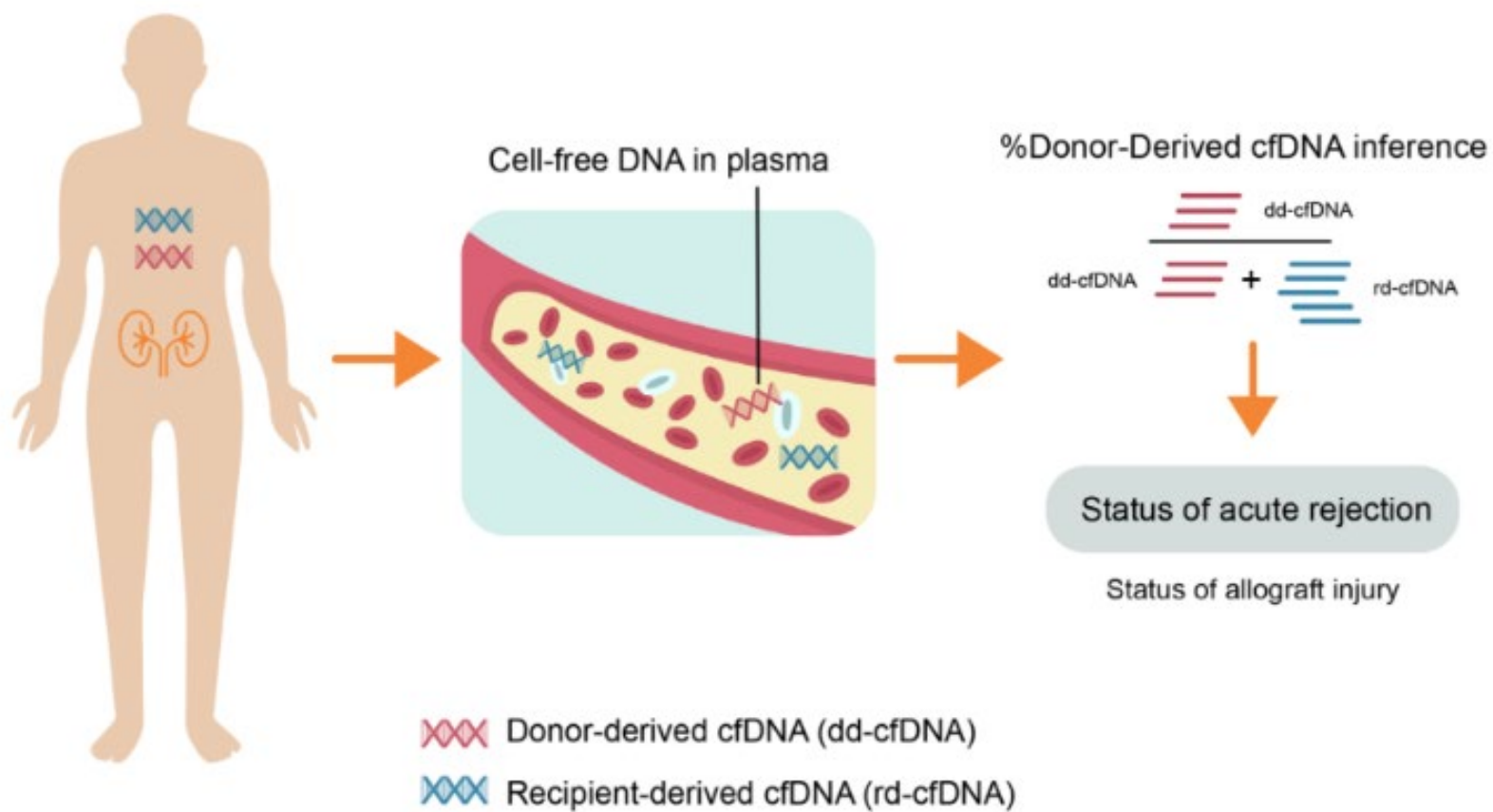
Disease	Target	Reference
AML	NPM1 IDH1/IDH2 WT1 PML-RARa PML-A216V C-kit	[32–34,39,41,42,48,51,52,55]
CML	BCR-ABL1 T315I	[108–113,119]
MDS	Alu methylation	[57]
MPNs	JAK2 CALR	[123,124,127,129]

ddPCR и имунотерапии

Disease	Target	Reference
ALLOGENEIC TRANSPLANTATION	Chimerism Chimerism & MRD T315I	[133,135–139]
AUTOLOGOUS TRANSPLANTATION	TRECs	[141]
IMMUNOTHERAPY	CAR-T	[145–147]

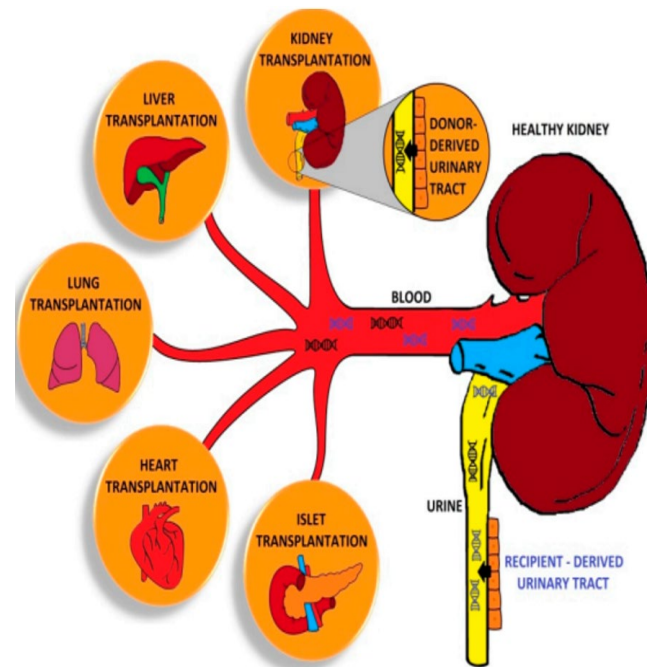
Адаптирано от Galimberti, S.; Balducci, S.; Guerrini, F.; Del Re, M.; Cacciola, R. Digital Droplet PCR in Hematologic Malignancies: A New Useful Molecular Tool. *Diagnostics* 2022, 12, 1305

Детекция на ранно отхвърляне при трансплантация



Течните биопсии: на g-cfDNA за детекция на травмиране на бъбречен алографт

- Серийни определяния на g-cfDNA могат рано да предложат или изключат остро и хронично отхвърляне, както и други травми на графта, като се избягват излишни биопсии.
- Като биомаркер dd-cfDNA има потенциала за икономически изгодно наблюдение на трансплантирани реципиенти за намаляване ретрансплантациите и преждевременната загуба на графт.
- Определянето на dd-cfDNA позволява детекция на недостатъчна имуносупресия и затова е полезна за минимизиране на имуносупресията.



Oellerich, M., Sherwood, K., Keown, P. et al. Liquid biopsies: donor-derived cell-free DNA for the detection of kidney allograft injury. *Nat Rev Nephrol* 17, 591-603 (2021).



Педиатрична генетика

Ранен постнатален скрининг за

Спинална Мускулна Атрофия
Муковизцидоза
Комбинирана имунодефицит



Детекция на болестни епигенетични промени - ddPCR при ранно откриване на детски болести с комплексна генетика.

С помощта на dPCR се откриват повишени нива на неметиран INS (препроинсулин) ген в сравнение с метилиран INS при деца с начало на тип I диабет.

Откриване на тризомия 21 с хиперметиран фетален ДНК маркер на 21 хромозома.

Butchbach, M.E.R. Applicability of digital PCR to the investigation of pediatric-onset genetic disorders, Biomolecular Detection and Quantification, vol. 10, Dec. 2016 Pp 9-14



Неинвазивна Пренатална Диагностика

Papers in Press. Published November 2, 2017 as doi:10.1373/clinchem.2017.278101
The latest version is at <http://hwmain.clinchem.aaccjnls.org/cgi/doi/10.1373/clinchem.2017.278101>

Clinical Chemistry 64:2
000–000 (2018)

Molecular Diagnostics and Genetics

Noninvasive Prenatal Diagnosis of Single-Gene Disorders by Use of Droplet Digital PCR

Joan Camunas-Soler,¹ Hojae Lee,¹ Louanne Hudgins,² Susan R. Hintz,³ Yair J. Blumenfeld,⁴
Yasser Y. El-Sayed,⁴ and Stephen R. Quake^{1,5,6*}

From www.bloodjournal.org by guest on July 23, 2017. For personal use only.

Regular Article



THROMBOSIS AND HEMOSTASIS

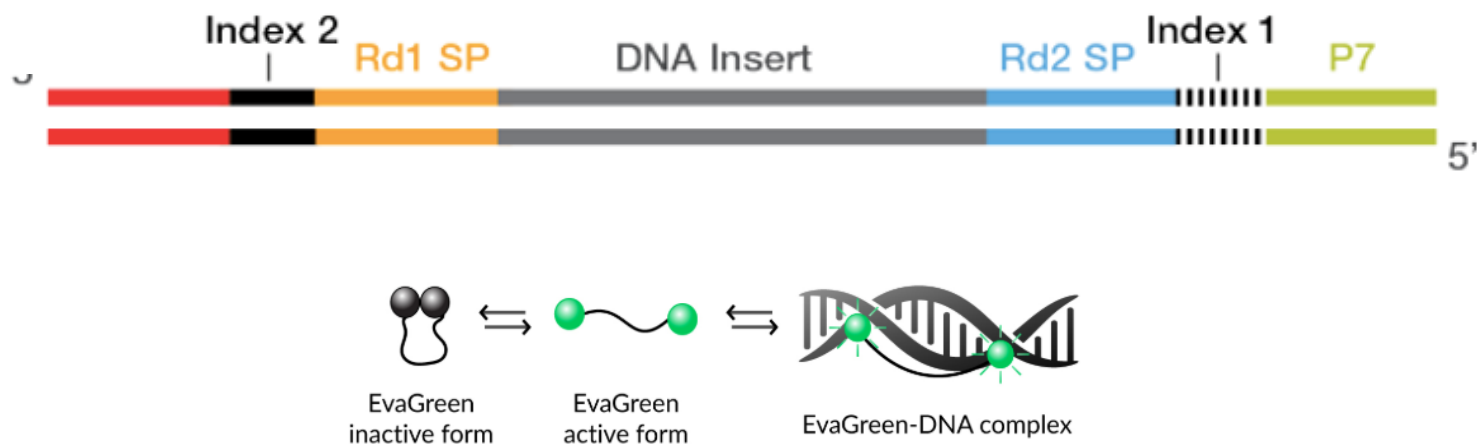
Noninvasive detection of *F8 int22h*-related inversions and sequence variants in maternal plasma of hemophilia carriers

Irena Hudecova,^{1,2} Peiyong Jiang,^{1,2} Joanna Davies,^{3,4} Y. M. Dennis Lo,^{1,2} Rezan A. Kadir,^{3,4} and Rossa W. K. Chiu^{1,2}

¹Centre for Research into Circulating Fetal Nucleic Acids, Li Ka Shing Institute of Health Sciences, Hong Kong, China; ²Department of Chemical Pathology, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, China; and ³Department of Obstetrics and Gynaecology and ⁴Katharine Dormandy Haemophilia and Thrombosis Center, Royal Free Hospital, London, United Kingdom

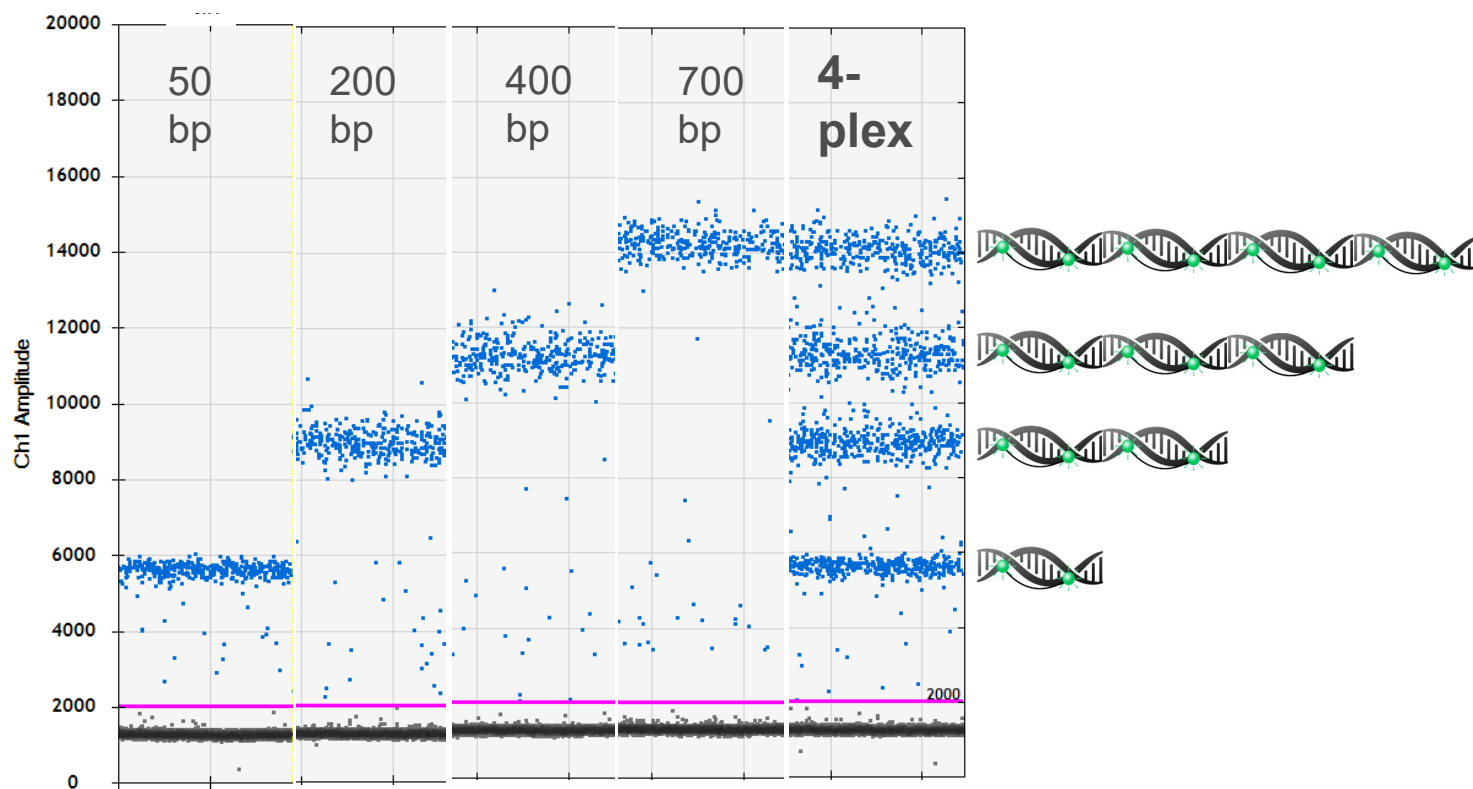


Качествен контрол на NGS библиотеки



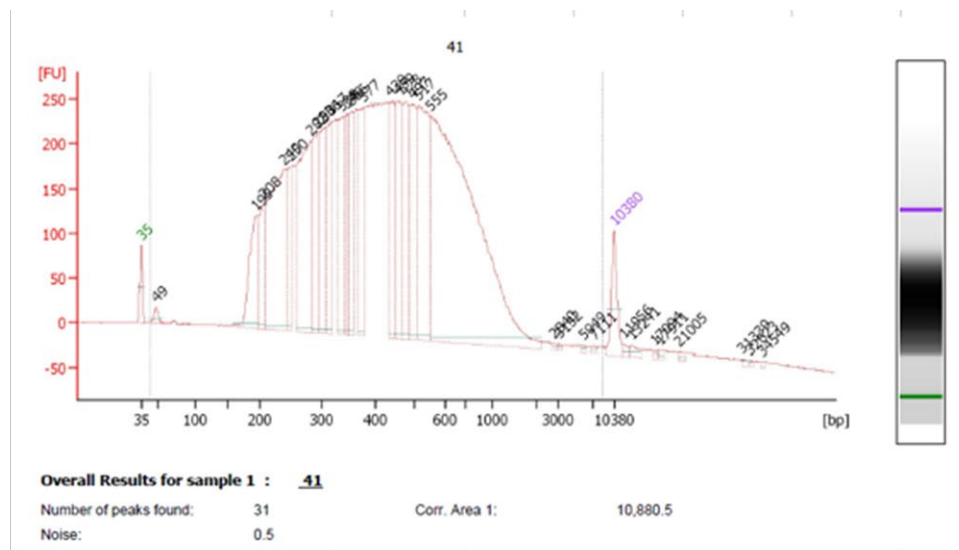
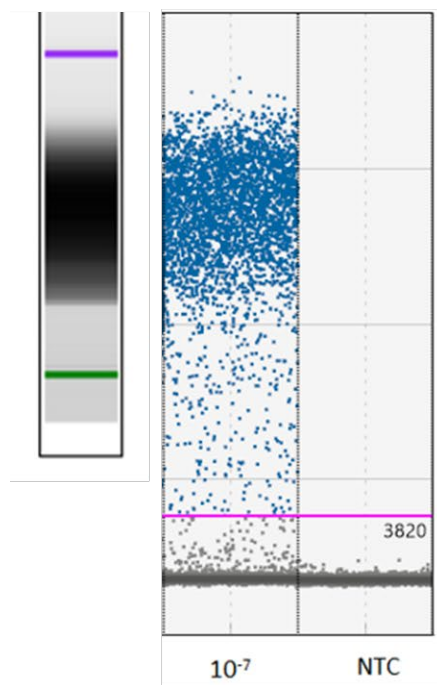


Качествен контрол на NGS библиотеки





Качествен контрол на NGS библиотеки

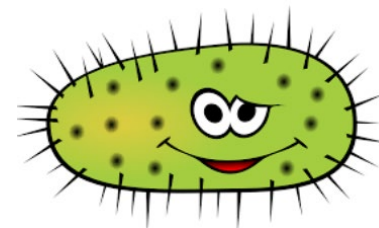


Experimental data kindly provided by Aneta Bugalová,
Comenius University, Bratislava



Приложения в клиничната микробиология

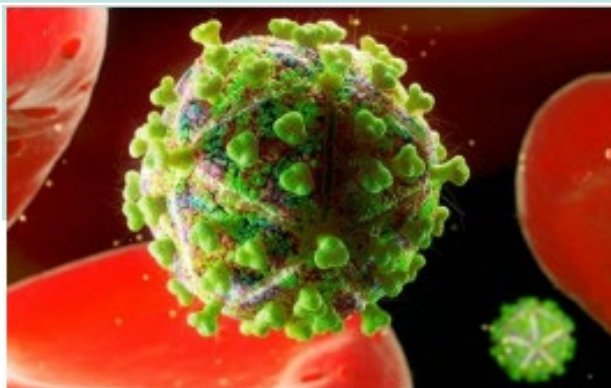
Достъпна, бърза и точна детекция на патогени и ефективно лечение.



- **ДНК и РНК вируси**
 - HIV DNA и HIV long terminal repeats (2-LTR)/ котрол на антивирусна терапия, латентни резервуари
 - CMV, hepatitis B virus, JC polyomavirus, HPV, HIV RNA, human T-lymphotropic virus, човешки риновируси
 - hepatitis C virus /трансплантации/
- **Количествено определяне на бактериални таргети**
Mycobacterium tuberculosis, Helicobacter pylori и др. ddPCR са много добри за **по-точна детекция на ниски патогенни товари.**
- **Сепсис**
- **Паразити** (напр. маларийните паразити Plasmodium falciparum и Plasmodium vivax) при всички възможни нива на инфекция поради значително по-високата си чувствителност от qPCR.

Li,H., Bai,R.,Zhenyu Zhao,Z. et al. Application of droplet digital PCR to detect the pathogens of infectious diseases; Bioscience Reports (2018) 38 BSR20181170 Review Article

ddPCR осигурява безпрецедентна чувствителност за детекция на HIV 2013



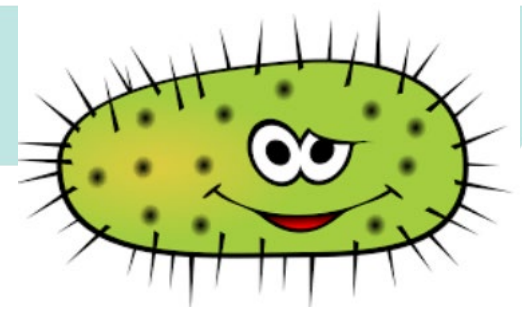
Метод

- Дете с инфекция потвърдена от позитивно HIV DNA/RNA тестване на 2 ден след раждане
- Тестове позитивни за вирусен товар в плазма на 7, 12, 20 ден
- Достига незабележими нива на възраст 29 ден
- Ултрачувствителни тестове (dd PCR) показаха много ниски, но измерими нива на HIV DNA на 24 и 26 месеца.

Ключови изводи

▪ Чувствителност и прецизност на ddPCR използвани да документират първи случай на функционално лечение при HIV+ дете

Age	HIV DNA detected by ddPCR	Replication-competent virus detected
24 months	37 copies/ million PBMC	No
26 months	4 copies/ million PBMC	No



RESEARCH

Open Access



Diagnostic advantage of droplet digital PCR over blood culture in sepsis: a retrospective study of 115 patients

Results Blood culture identified pathogens in 27.8% of patients, whereas ddPCR detected organisms in 53%. ddPCR

Sensitive and rapid identification of pathogens by droplet digital PCR in a cohort of septic patients: a prospective diagnostic study

Results

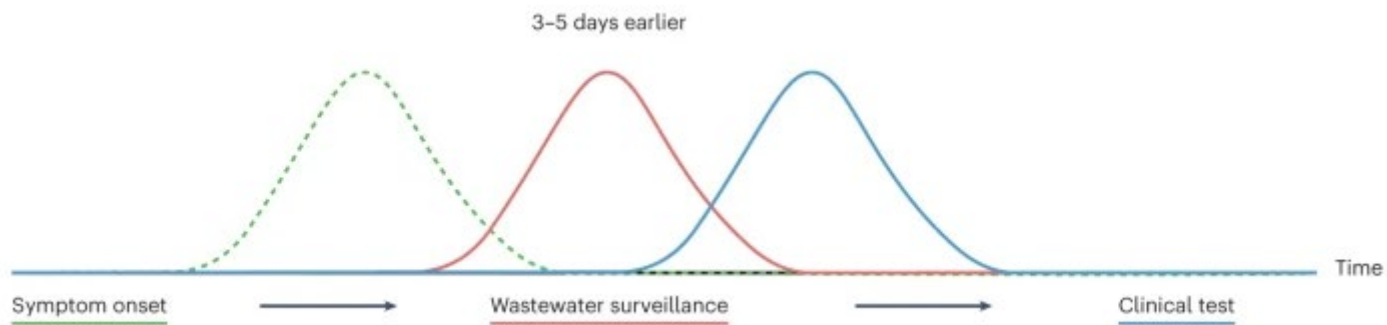
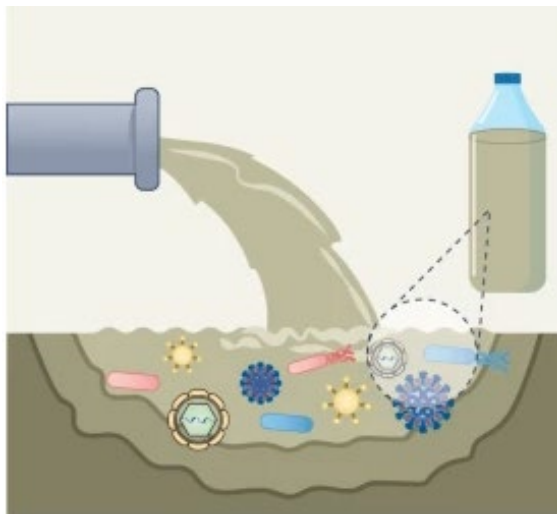
In comparison to blood culture, the ddPCR panel exhibited an overall sensitivity of 75.0% and a specificity of 69.7%, ddPCR yielded an additional detection rate of 17.0% for sepsis cases overall, with a turnaround time of 2.5 h. The sensitivity of ddPCR in the empirical antibiotic treatment and the non-empirical antibiotic treatment group were 78.6% versus 80.0% ($p > 0.05$). Antimicrobial resistance



Мониторинг на патогени в популацията

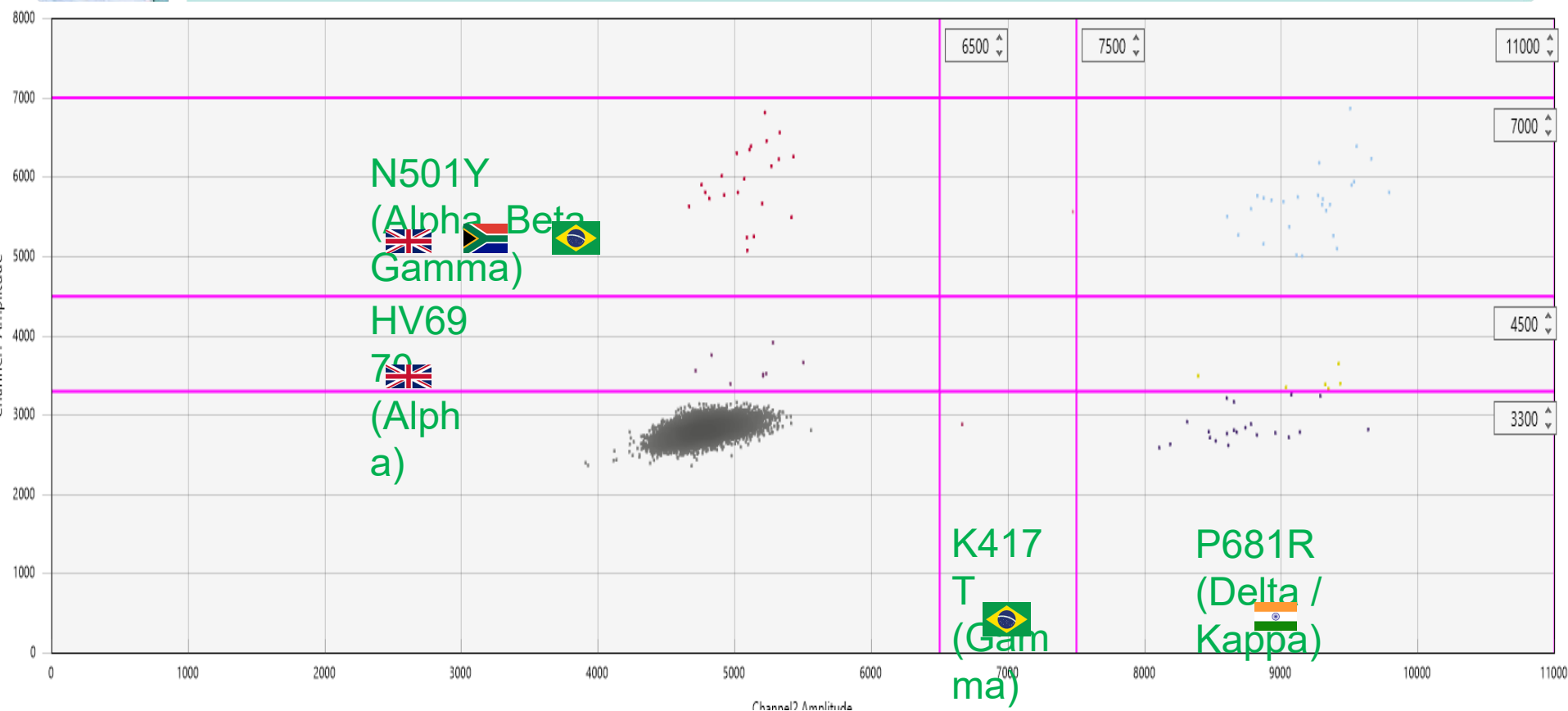


Мониторинг на патогени в популацията

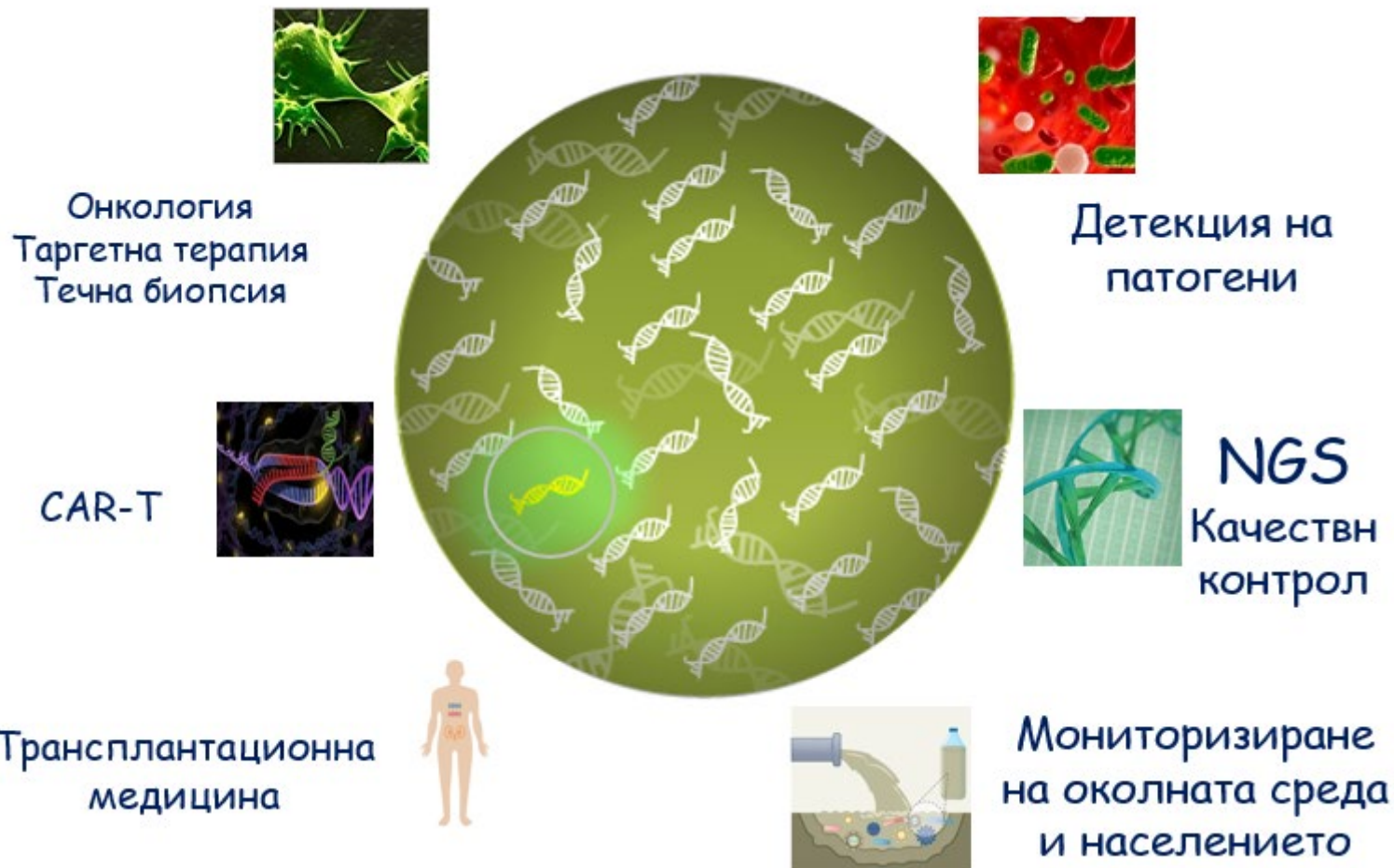


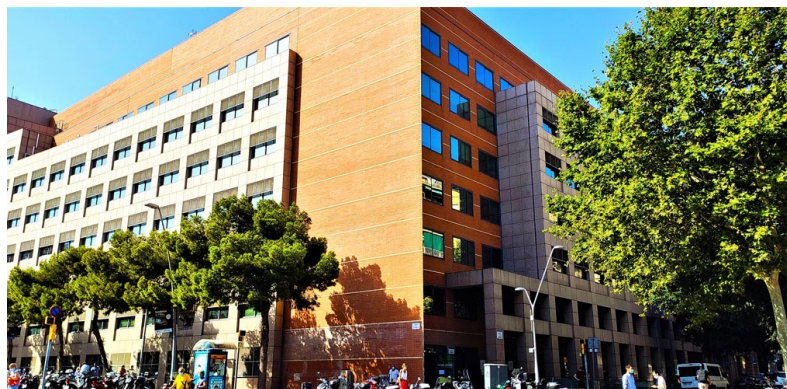


Мониторинг на патогени в популацията

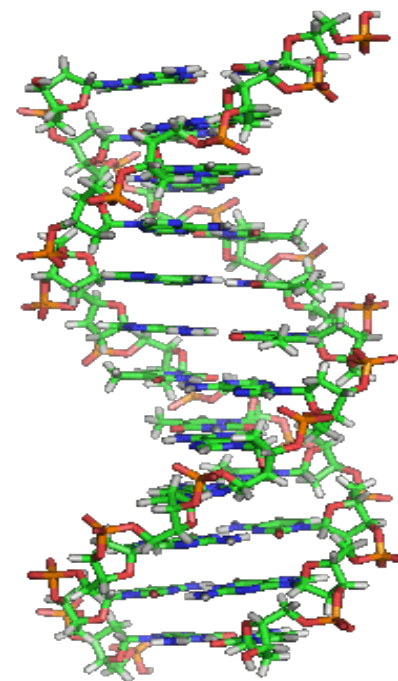
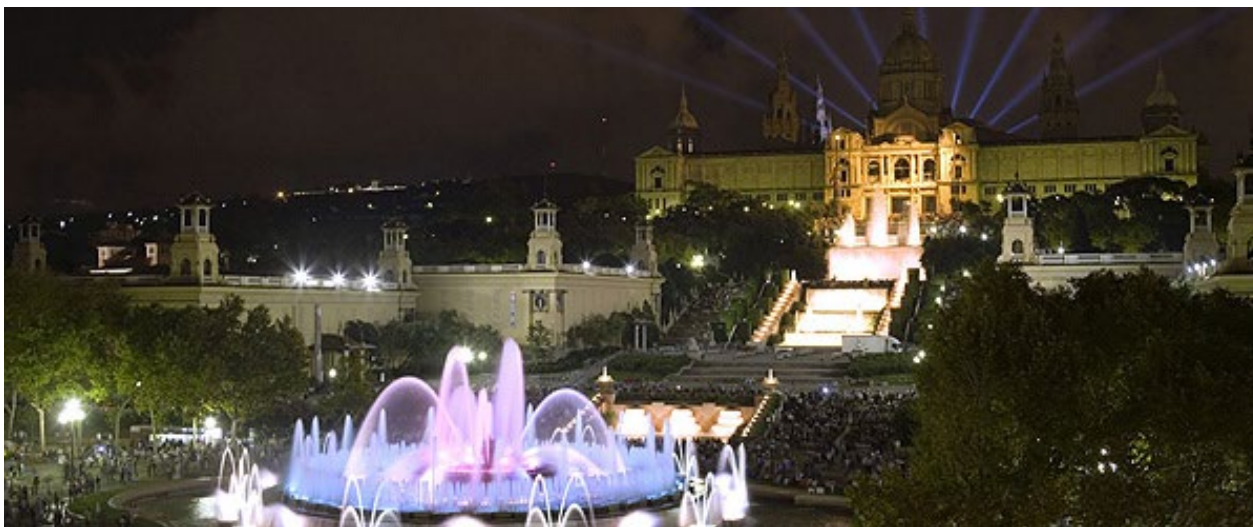


Дигитален PCR – потенциал за едно по-здроо общество





Благодаря за
Вниманието !



MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN

UNIÓN EUROPEA



FONDO EUROPEO DE
DESARROLLO REGIONAL
"Una manera de hacer Europa"

