Экспресс-методы проточного латерального иммуноанализа для определения маркеров рака простаты, острого инфаркта миокарда и аллергии

А.П.Осипов, В.Г.Григоренко, И.П.Андреева, Е.А.Яковлева, А.М.Егоров

Кафедра Химической энзимологии **Химического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские Горы, 1, стр.3**

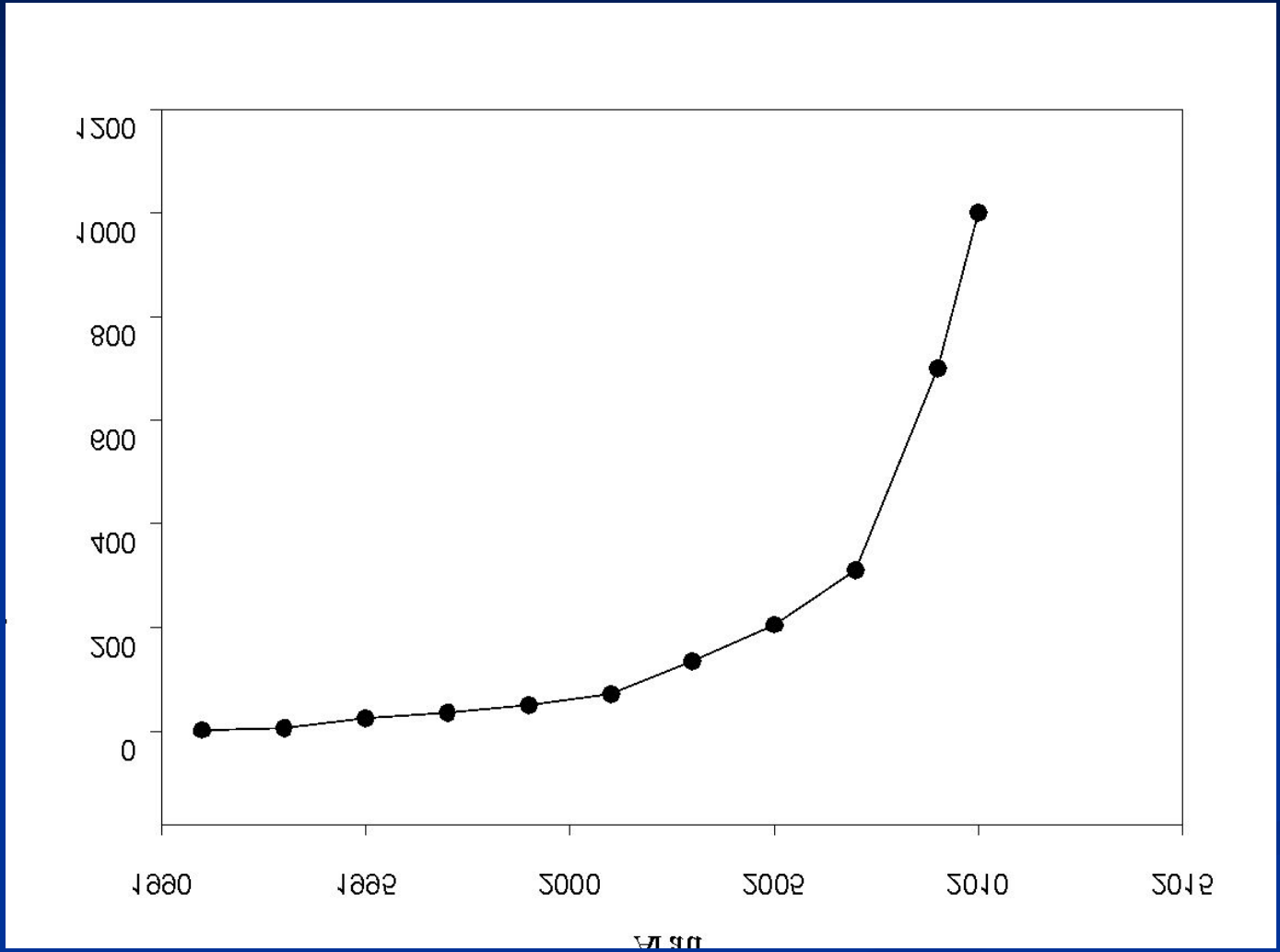
Закрытое акционерное общество «НВО Иммунотех», 119991 Москва, Ленинские Горы, МГУ им. М.В.Ломоносова, 1, стр.11а

E-mail: AOsipov@immunotek.ru

Продажи быстрых тестов для медицинской диагностики в мире

Диагностические направления	ОБЪЕМ ПРОДАЖ В 2007 г., млн $	ДОЛЯ НА РЫНКЕ, %	ОБЪЕМ ПРОДАЖ В 2012 г., млн $	ДОЛЯ НА РЫНКЕ, %	ГОДОВОЙ ПРИРОСТ, %
БЕРЕМЕННОСТЬ	695	35	775	24	2
ИНФЕКЦИИ	400	20	850	26	16
КАРДИОМАРКЕРЫ	425	21	850	26	15
ХОЛЕСТЕРИН / ЛИПИДЫ	260	13	490	15	14
ЛЕКАРСТВА	145	7	165	5	3
ДРУГИЕ (ТТГ, ПСА, ФСГ и т.д.)	85	4	110	3	5
ВСЕГО	2010	100	3240	100	10

ЧИСЛО ПУБЛИКАЦИЙ ПО МЕТОДАМ ПРОТОЧНОГО ЛАТЕРАЛЬНОГО ИММУНОАНАЛИЗА ПО ГОДАМ



ОСНОВНЫЕ ДОСТОИНСТВА МЕТОДОВ ЛАТЕРАЛЬНОГО ПРОТОЧНОГО ИММУНОАНАЛИЗА

- Короткое время анализа (5-10 минут)
- Хранение при комнатной температуре
- Срок хранения тестов 24 месяца
- Полная готовность к использованию
- Минимальный требуемый объем образца
- Система внутреннего контроля

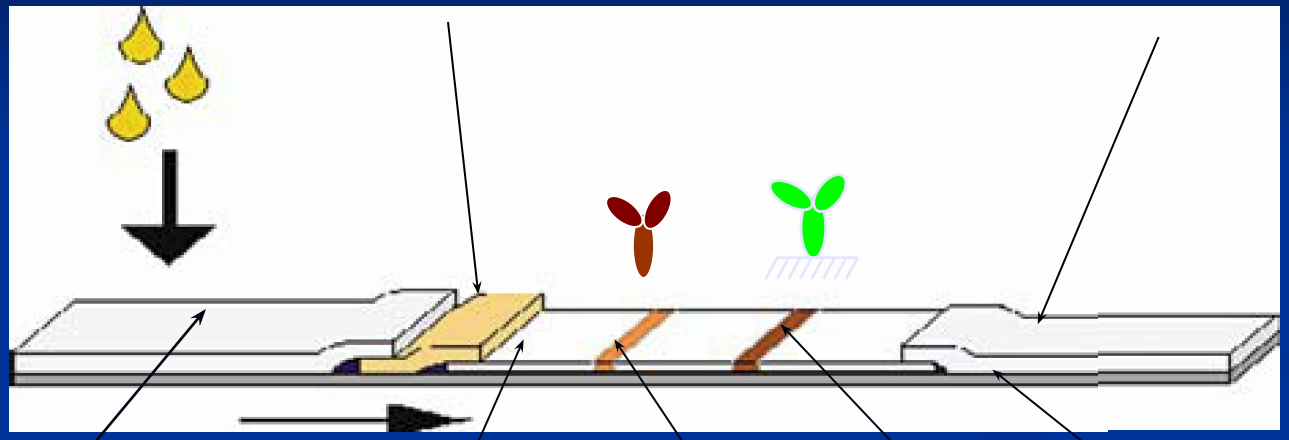
СТРОЕНИЕ ТЕСТ-ПОЛОСКИ ДЛЯ ЛАТЕРАЛЬНОГО ПРОТОЧНОГО ИММУНОАНАЛИЗА

(Иммунохроматографический анализ)

Образец

Мембрана для конъюгата золота с Ат

Впитывающая мембрана



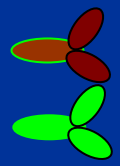
Мембрана для нанесения образца

Нитроцеллюлозная мембрана

Тестовая линия

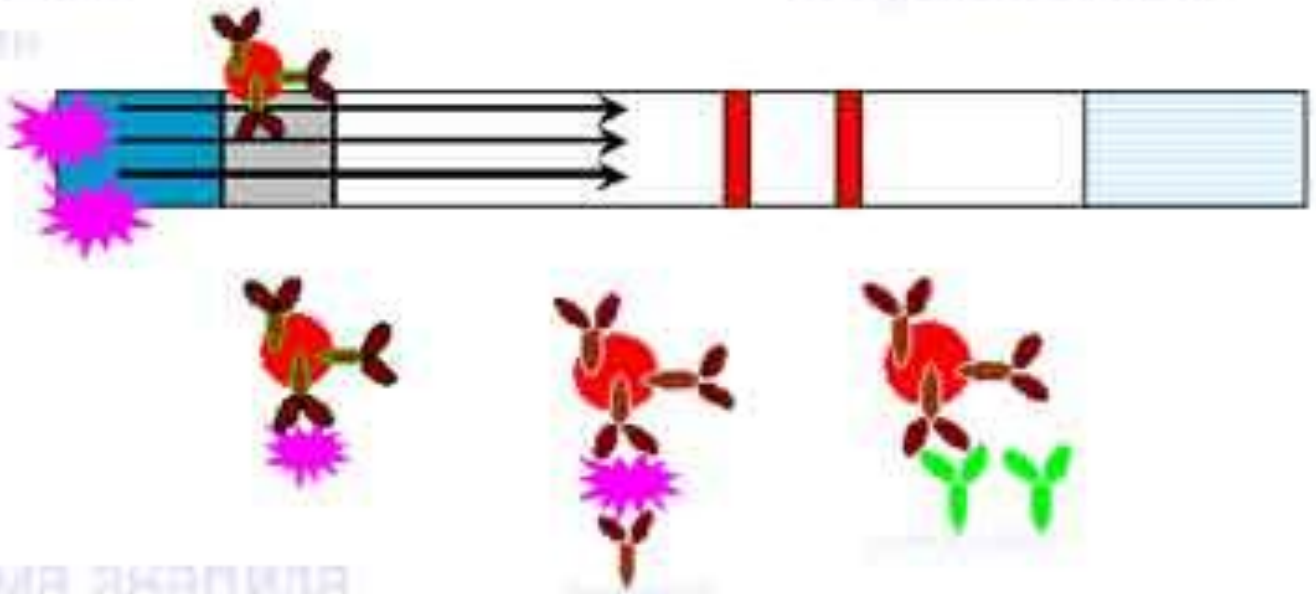
Контрольная линия

Пластмассовая основа

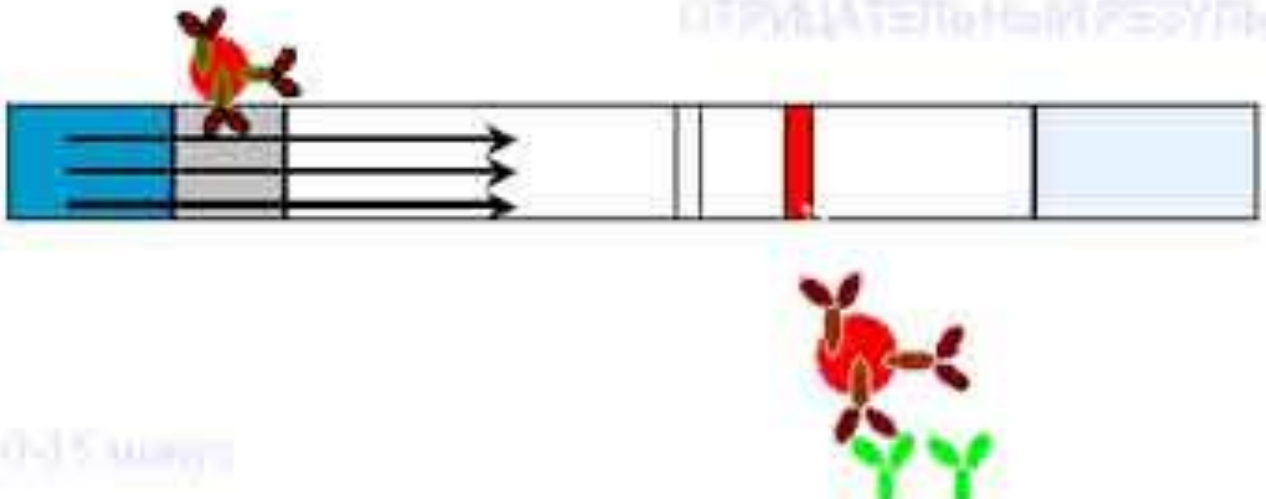


- специфические антитела

- вторичные антитела

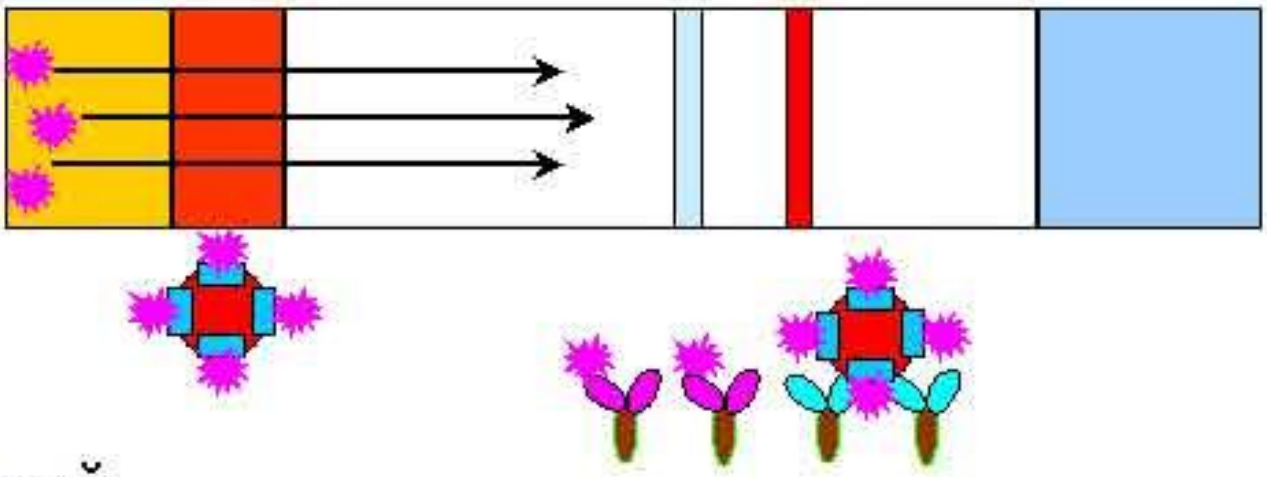


Сэндвич-схема анализа



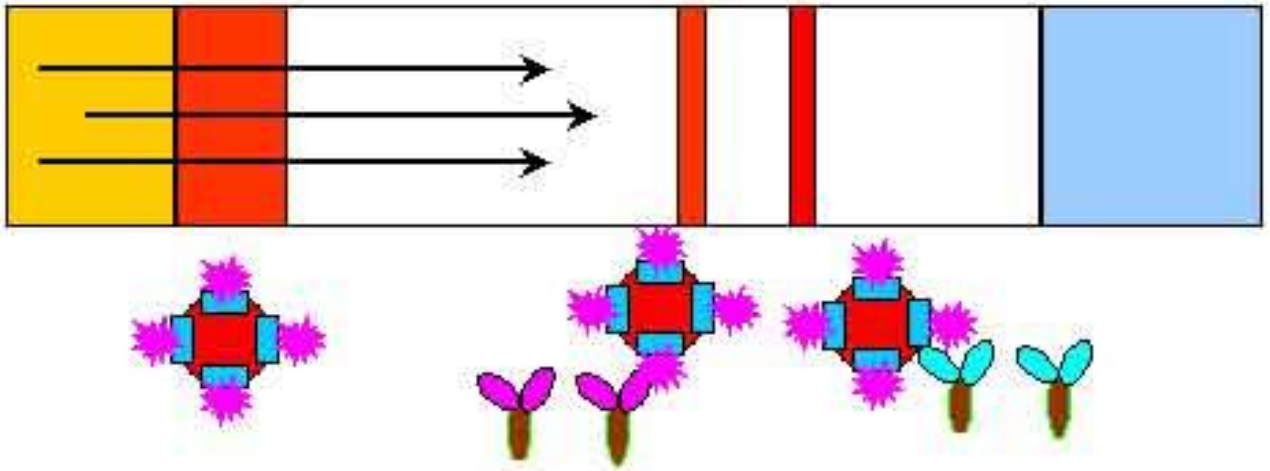
Время анализа – 10-15 минут

ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ



Конкурентный анализ

ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ



Основные технологические стадии процесса производства быстрых тестов

МЕМБРАННАЯ СИСТЕМА

СОРБЦИЯ АНТИТЕЛ

ВЫСУШИВАНИЕ

БЛОКИРОВКА

ВЫСУШИВАНИЕ

ПОЛУЧЕНИЕ, СТАБИЛИЗАЦИЯ И НАНЕСЕНИЕ КОНЪЮГАТА

ПОДЛОЖКА ДЛЯ КОНЪЮГАТА

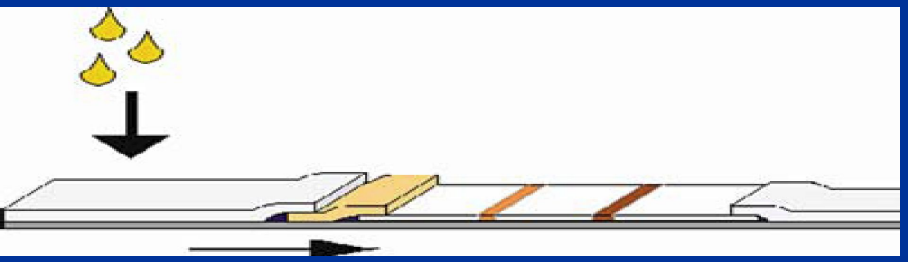
ВЫСУШИВАНИЕ

ПОДЛОЖКА ДЛЯ ОБРАЗЦА

ПРЕДОБРАБОТКА

ВЫСУШИВАНИЕ

КОМПОНОВКА МЕМБРАН, ПОДЛОЖКИ ДЛЯ КОНЪЮГАТА И ОБРАЗЦА, ЛАМИНИРОВАНИЕ

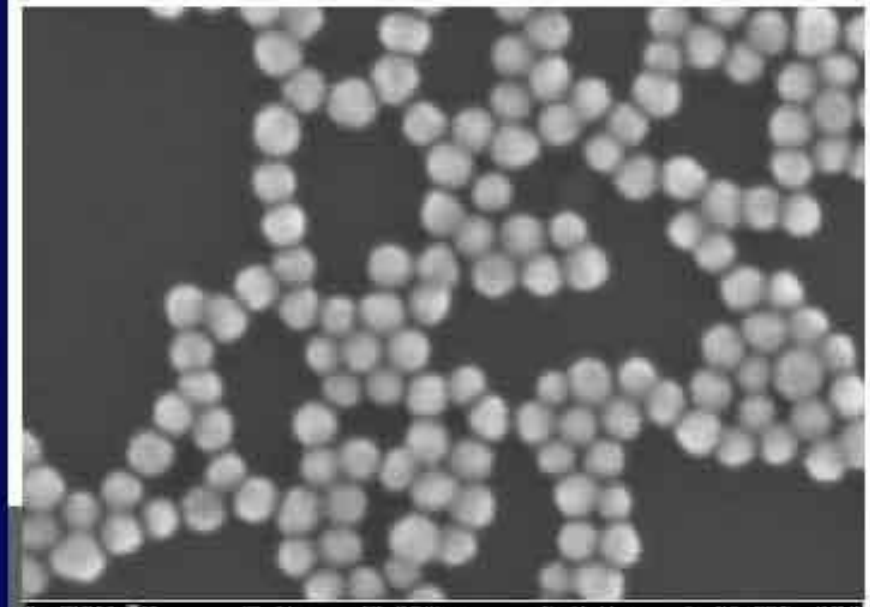


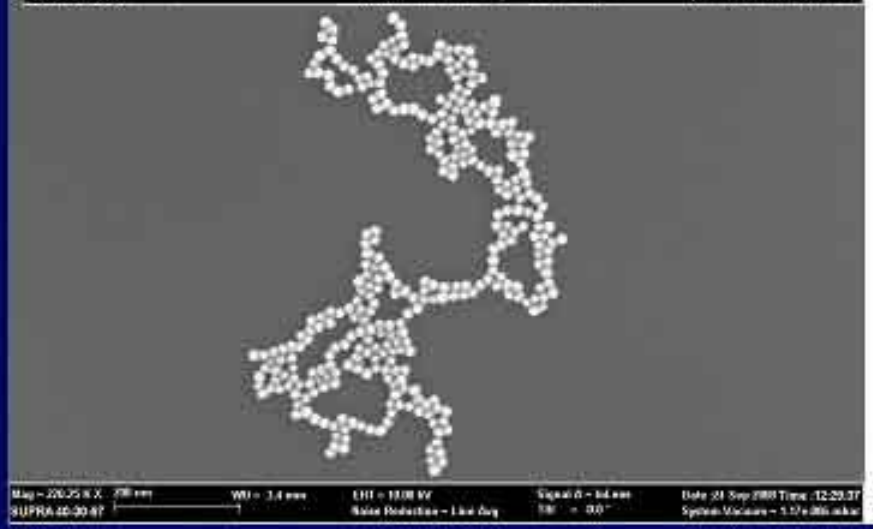
РЕЗКА ГОТОВЫХ КАРТОЧЕК НА ПОЛОСКИ

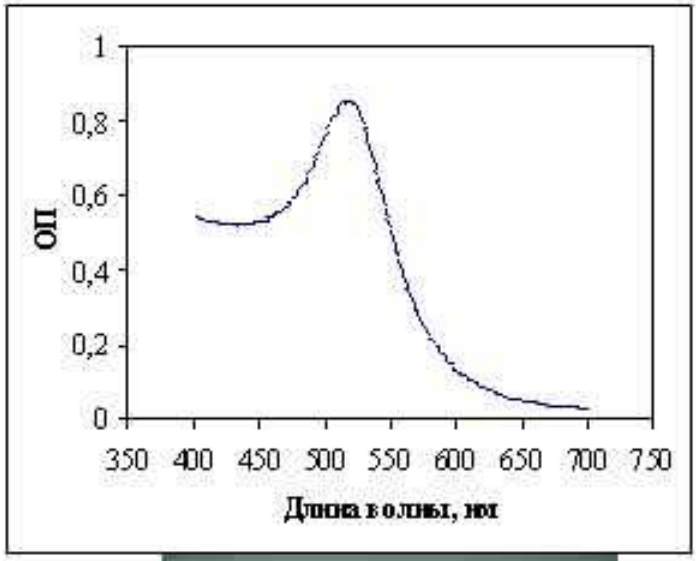
УКЛАДКА ПОЛОСОК В ПЕНАЛЫ ИЛИ КАССЕТЫ

УПАКОВКА КАССЕТ В ФОЛЬГУ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАЗМЕРОВ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА



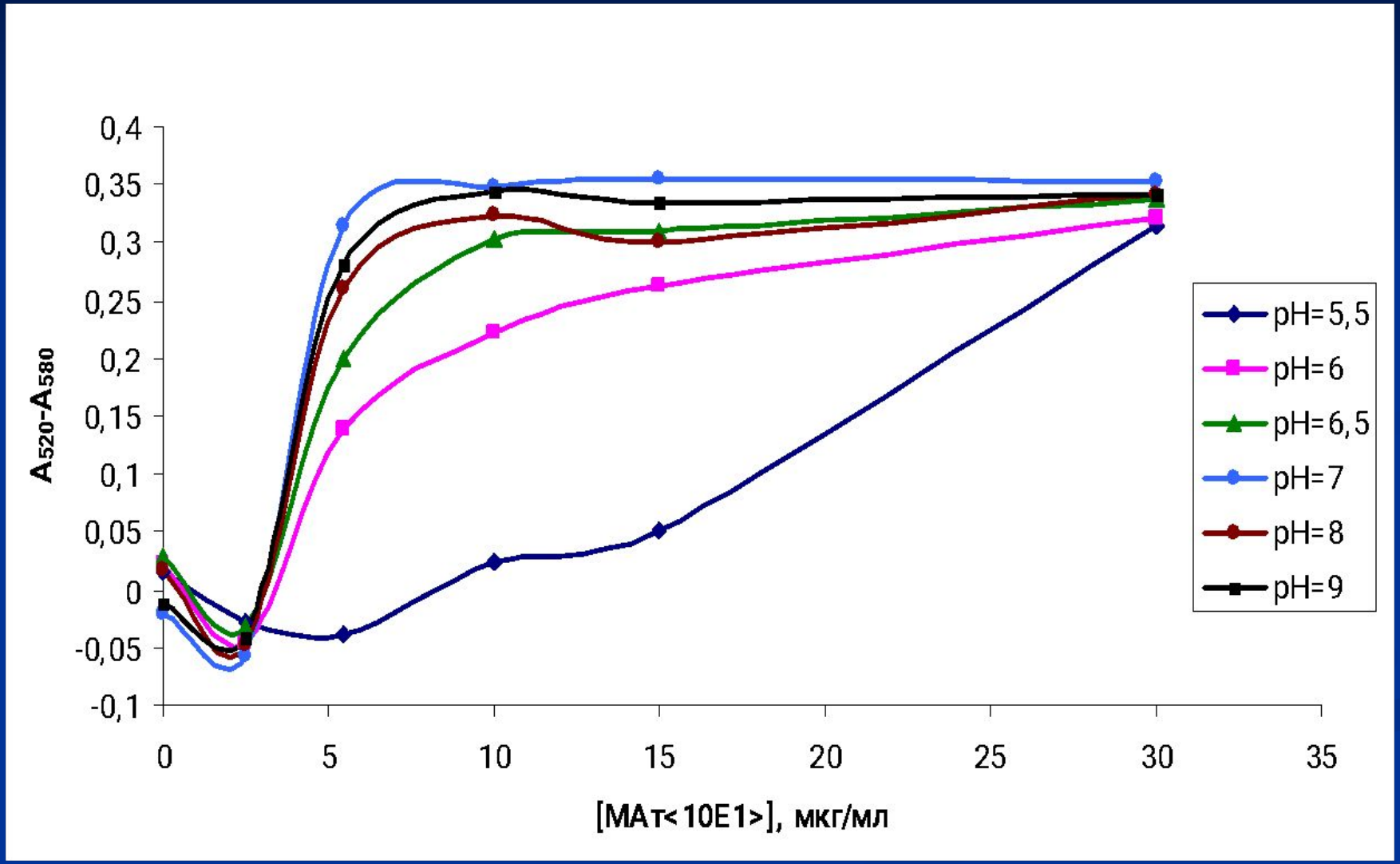




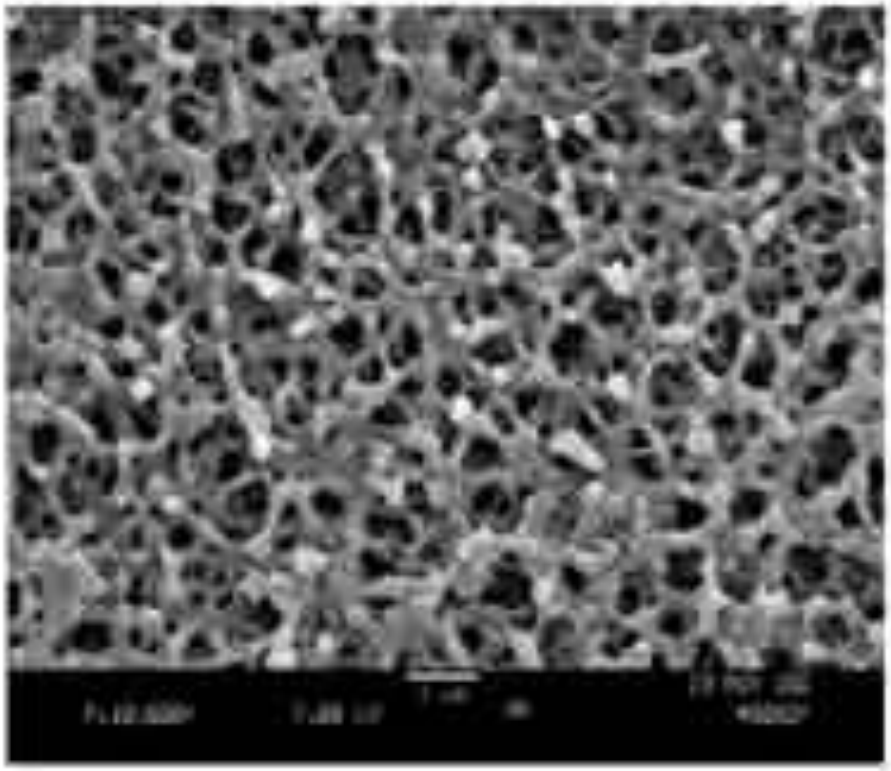
Свойства наночастиц золота с различным размером

Размер частиц (nm)	Площадь поверхности (nm^2)	Число молекул IgG на частицу
3	28	1
5	78	2
10	314	7
15	706	17
30	2826	64

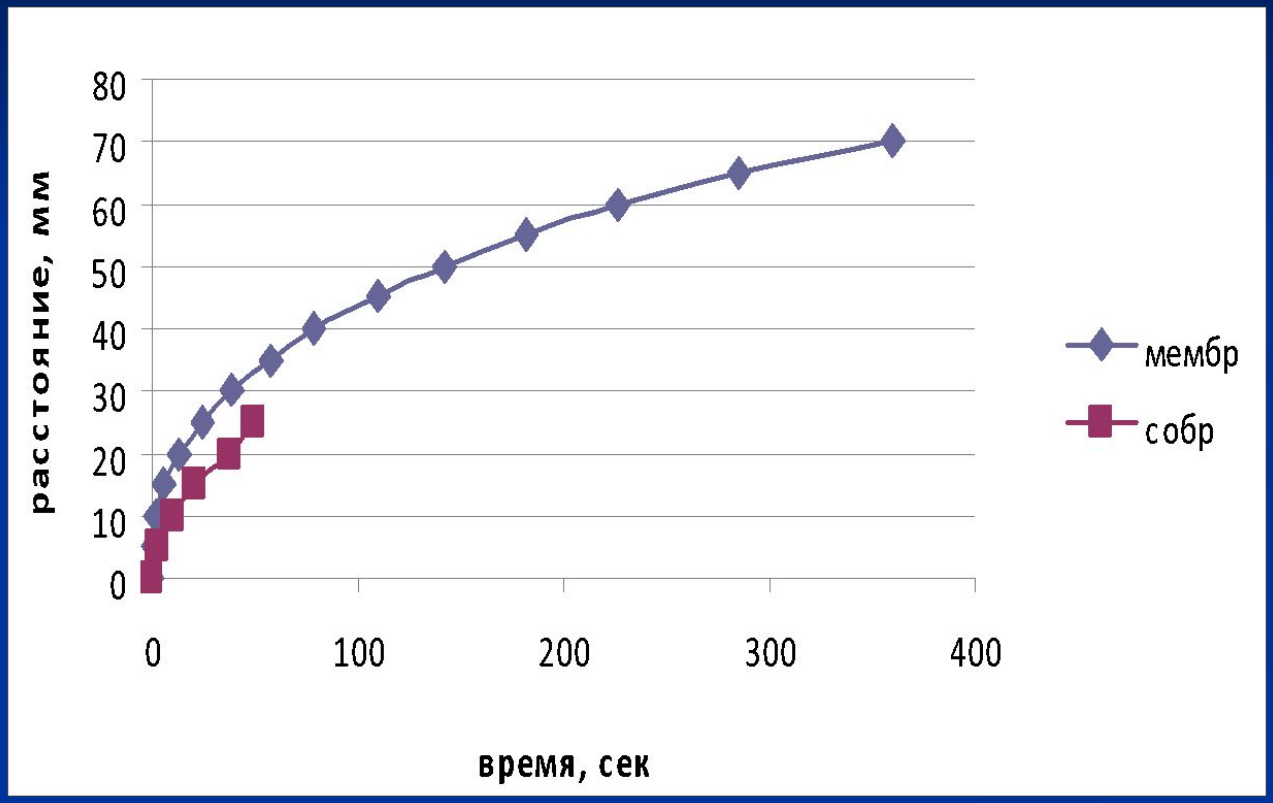
Влияние pH и концентрации антител на стабильность конъюгатов золота



Структура аналитической нитроцеллюлозной мембраны

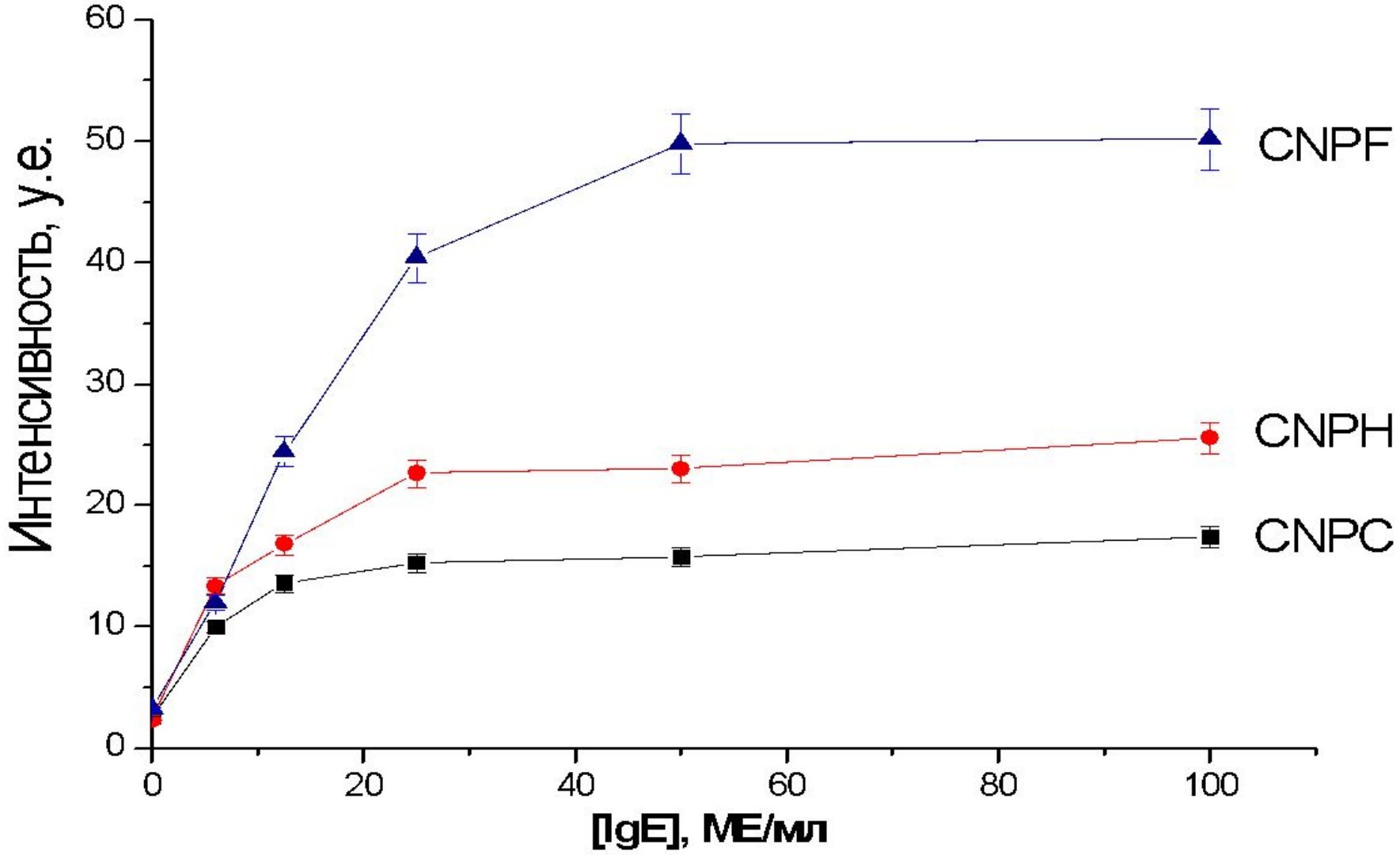


Зависимость скорости распространения потока вдоль мембраны от расстояния



ВЫБОР ТИПА АНАЛИТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ

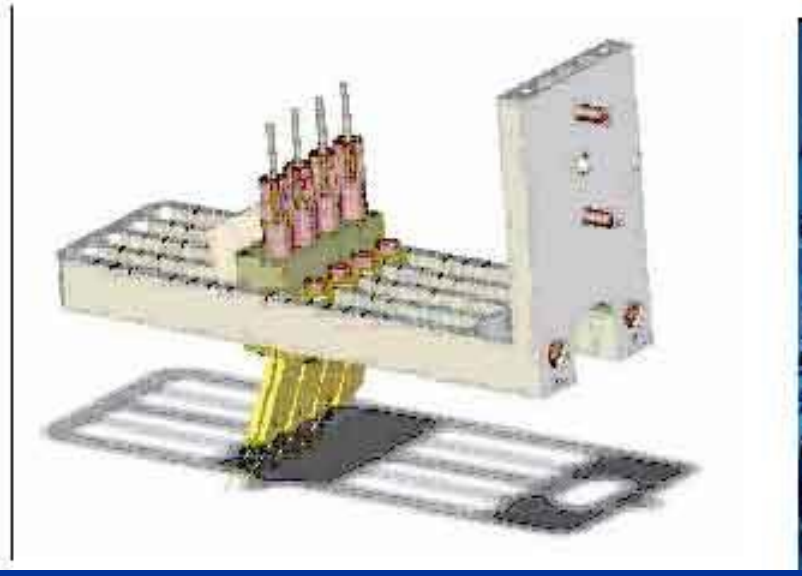
мАт<100рН3> иммобилизованы на мембране
конъюгат мАт<8> с наночастицами золота



Нанесение тестовой и контрольной линий на аналитическую мембрану

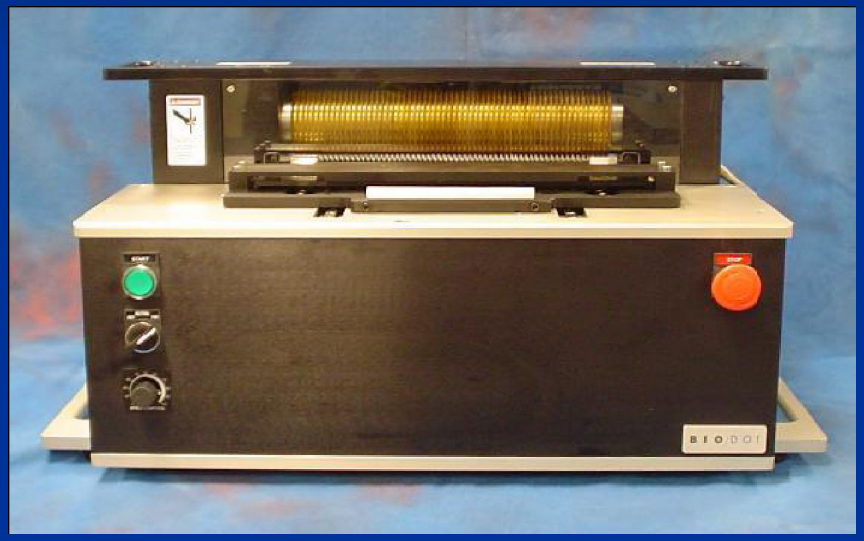
1.Контактный способ

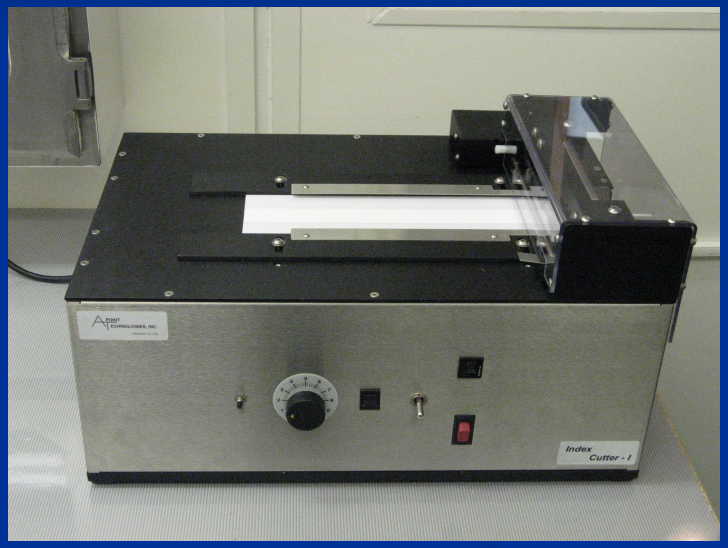
2.Бесконтактный способ



Компоновка мембран с помощью ламинатора

Резка мембранных полосок





РАЗЛИЧНЫЕ ФОРМАТЫ ГОТОВЫХ УСТРОЙСТВ ДЛЯ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

ИммуноХА-ПСА-экспресс
ЗАО «НВО Иммунотех»

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ
№ ФСР 2011/10462

от **13 апреля 2011 года** Срок действия: **не ограничен.**

Настоящее удостоверение выдано
ЗАО "НВО ИММУНОТЕХ",
Россия, 119899, Москва, Воробьевы горы, МГУ им. М.В. Ломоносова,
ул. Менделеевская, стр. 2

и подтверждает, что изделие медицинского назначения
Набор реагентов для полуколичественного иммунохроматографического экспресс-определения специфического антигена предстательной железы в сыворотке крови ("ИммуноХА-ПСА-Экспресс")
по ТУ 9398-028-11361534-2010

производства
ЗАО "НВО ИММУНОТЕХ",
Россия, 119899, Москва, Воробьевы горы, МГУ им. М.В. Ломоносова,
ул. Менделеевская, стр. 2

класс потенциального риска **2б** ОКП **93 9817**

соответствующее комплекту регистрационной документации

КРД № 74815 от **14.12.2010**

приказом Росздравнадзора **от 13 апреля 2011 года № 1926-Пр/11**

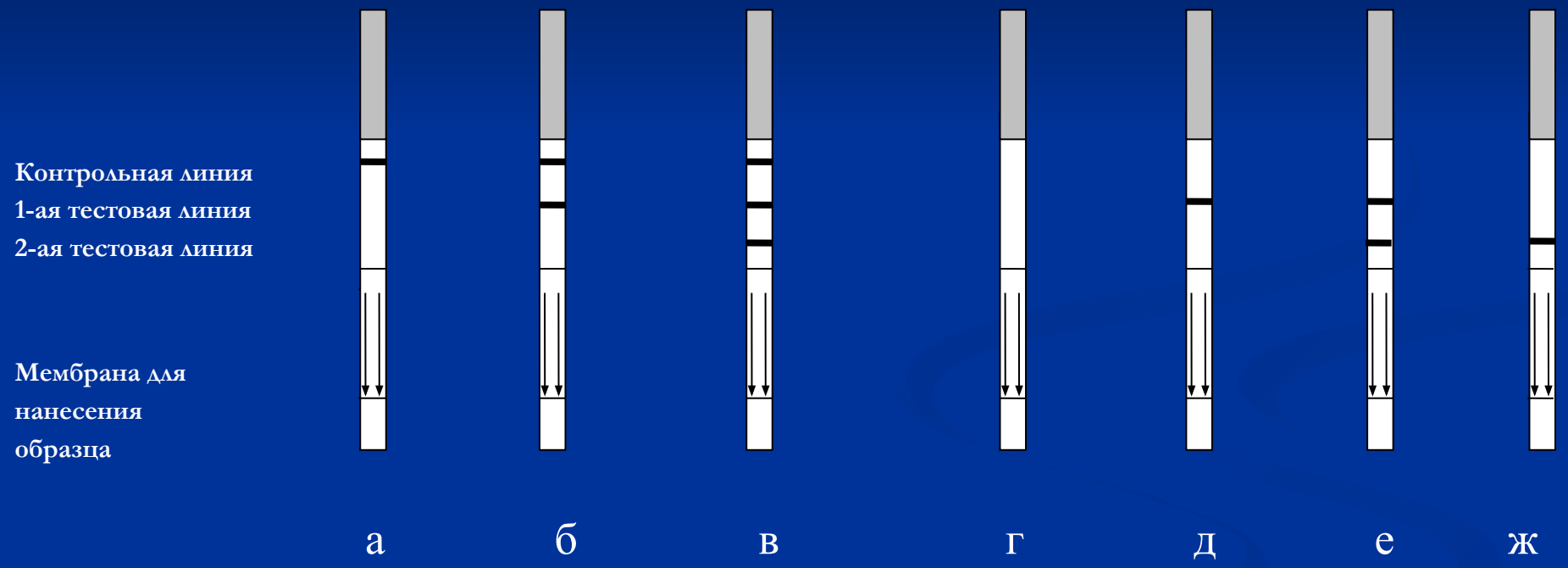
разрешено к производству, продаже и применению на территории Российской Федерации

Врио руководителя Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения **Е.А. Тельнова**
и социального развития

012667

Интерпретация результатов анализа ПСА иммунохроматографическим тестом производства «НВО Иммунотех»

а – отрицательный; б, в – положительный; г, д, е, ж – ошибочный



а) концентрация ПСА менее 3 нг/мл
б) концентрация ПСА в диапазоне от 3 до 10 нг/мл
в) концентрация ПСА выше 10 нг/мл

ИммуноХА-ПСА-экспресс

ЗАО «НВО Иммунотех»

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

1. Нанести 30 мкл образца на край тест-полоски.
2. Погрузить нижний край тест-полоски в лунку с буферным раствором.
3. Через 15 мин визуально оценить результат (одна розово-фиолетовая линия – менее 3 нг/мл, две - от 3 до 10 нг/мл, три - более 10 нг/мл).

ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

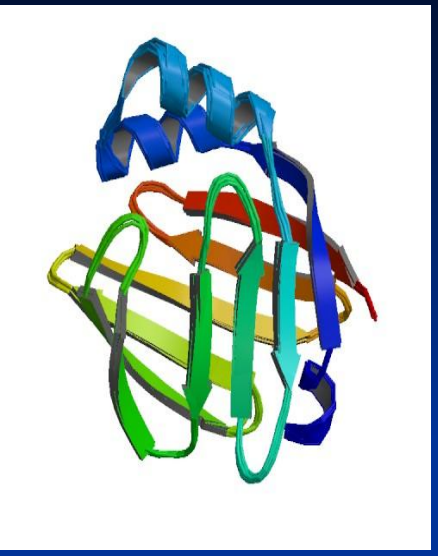
Чувствительность:	не более 3 нг/мл
Специфичность:	не наблюдается перекрестных реакций с другими компонентами сыворотки крови
Диапазоны определяемых концентраций:	первый - менее 3 нг/мл; второй - от 3 до 10 нг/мл; третий - более 10 нг/мл
Условия инкубации (время, t°C) :	15 мин при +(20-25)°C
Время проведения анализа:	15 минут
Количество анализируемой сыворотки:	30 мкл
Количество анализов:	20 исследуемых образцов
Срок годности набора:	12 месяцев

Экспресс-исследование уровня тропонина и миоглобина – необходимый этап диагностики и мониторинга больных с острым инфарктом миокарда, инсультом и стенокардией

Стандарты утверждены приказами МЗ РФ

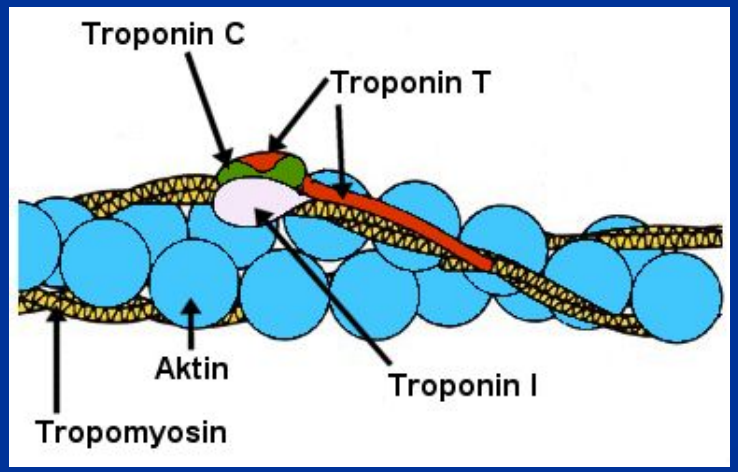
- **Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 2 августа 2006 г. N 582 "Об утверждении стандарта медицинской помощи больным с острым инфарктом миокарда"**
- **Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 5 сентября 2006 г. N 643 "Об утверждении стандарта медицинской помощи больным с инсультом, не уточненным как кровоизлияние или инфаркт"**
- **Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 25 сентября 2006 г. N 671 "Об утверждении стандарта медицинской помощи больным со стенокардией (грудной жабой)"**
- Приказ Минздравсоцразвития России № 599н от 19 сентября 2009 г.
- "Об утверждении Порядка оказания плановой и неотложной медицинской помощи населению Российской Федерации при болезнях системы кровообращения кардиологического профиля"

Маркеры ОИМ

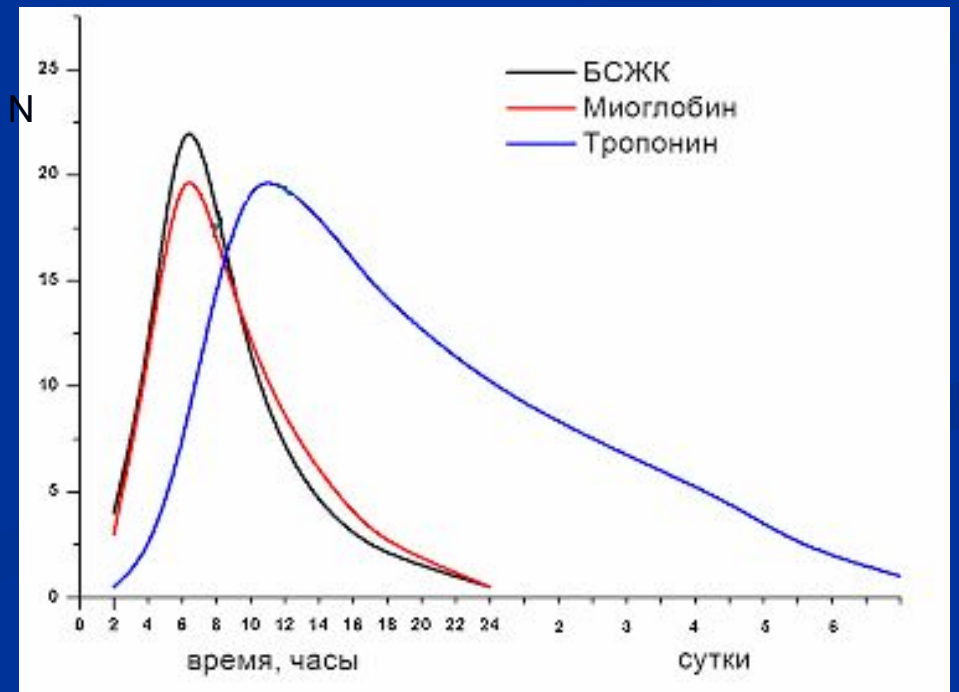


Маркер	Пороговый уровень	Максимум	Нормализация параметра	Специ-фичность,%
Тропонин I	1 нг/мл	12-16 ч	10-12 дней	91
Миоглобин	90 нг/мл	4-6 ч	12-24 ч	60
с-БСЖК	6 нг/мл	4-6 ч	12-24 ч	93

Белок, связывающий жирные кислоты (с-БСЖК)



Комплекс тропонина

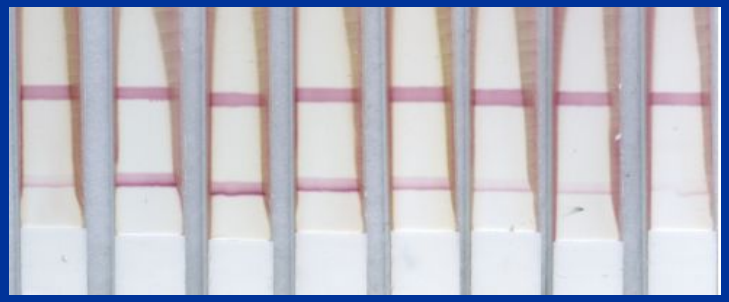


Определение с-БСЖК в сыворотках крови для диагностики острого инфаркта миокарда

1. Контрольная группа (N=25) - с-БСЖК не был обнаружен

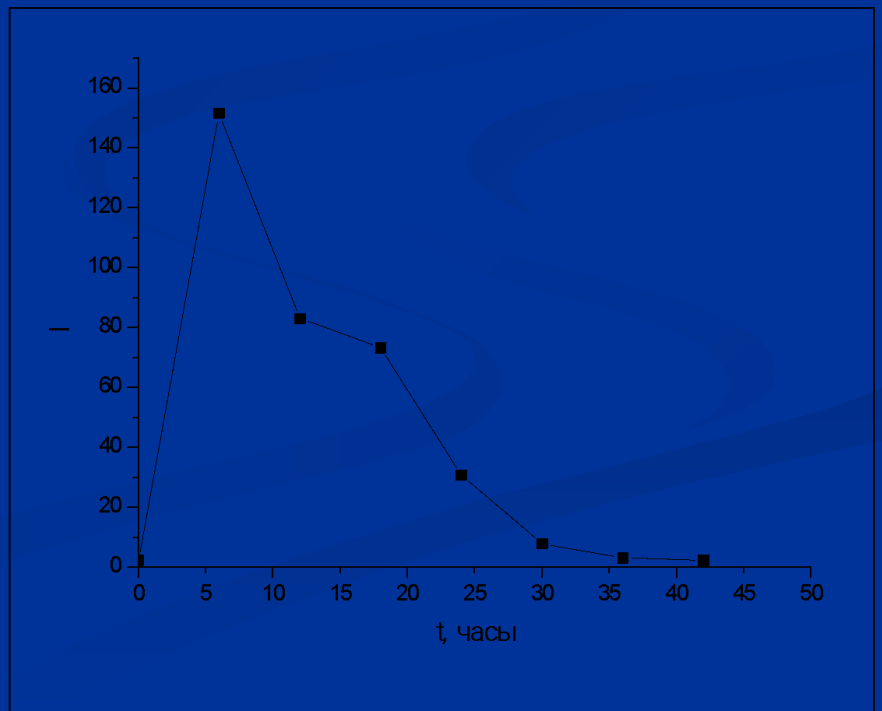
2. Пациенты с подтвержденным диагнозом острого инфаркта миокарда (N=13) – с-БСЖК обнаружен во всех образцах, взятых у пациентов при поступлении в больницу

Пациент №13
(Клиническая больница №67)



1 2 3 4 5 6 7 8

1 – при поступлении
2 – через 6 часов
3 – через 12 часов
4 – через 18 часов
5 – через 24 часа
6 – через 30 часов
7 – через 36 часов
8 – через 42 часа



Тесты для диагностики острого инфаркта миокарда

Rennesens GmbH, Germany

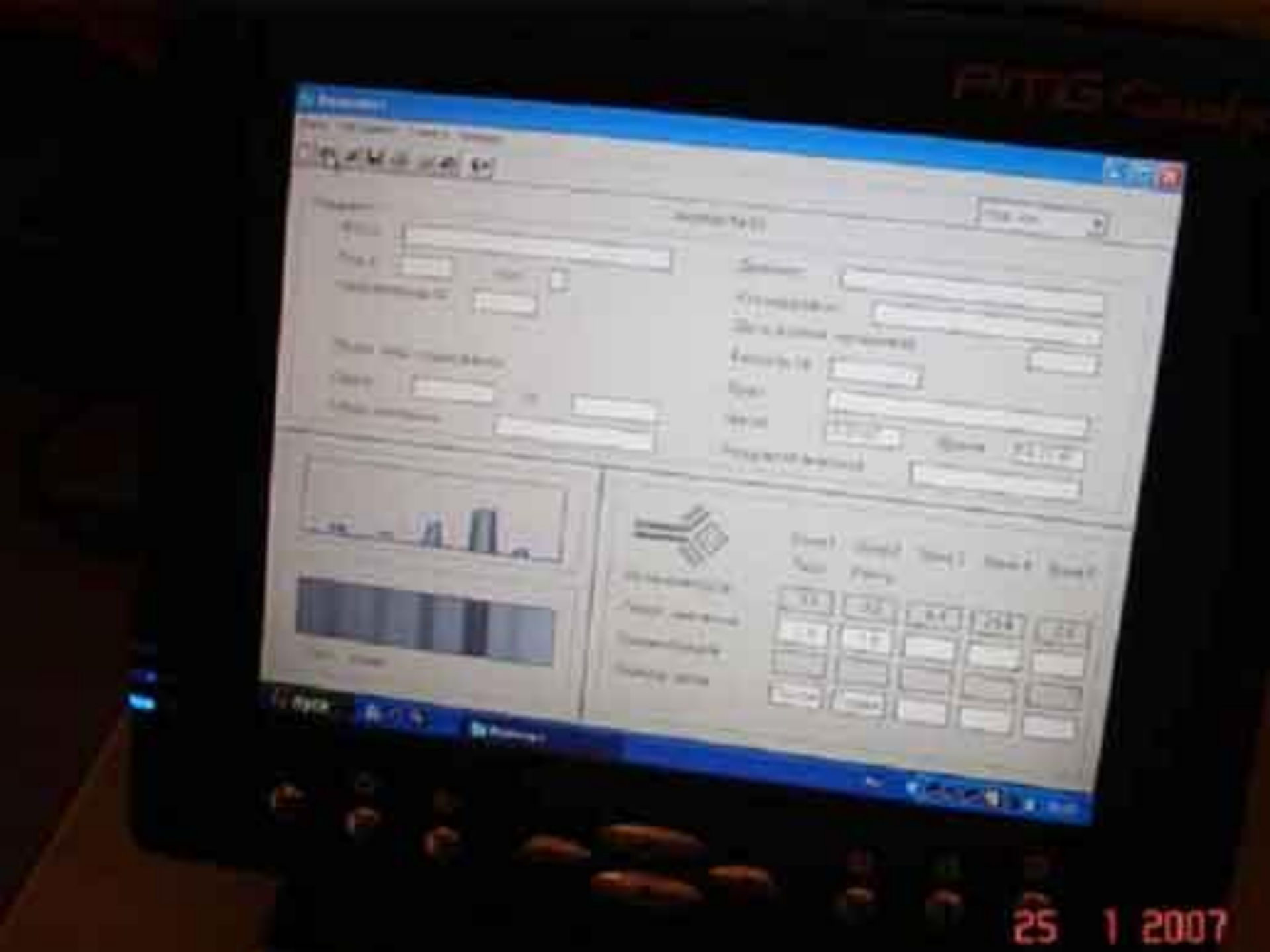
Трехкомпонентный Кардиотест «ИммунТех», YD Diagnostics, Ю.Корея (Юнимед)

Duo Troponin I - MGL Test, «VedaLab», (Диакон)

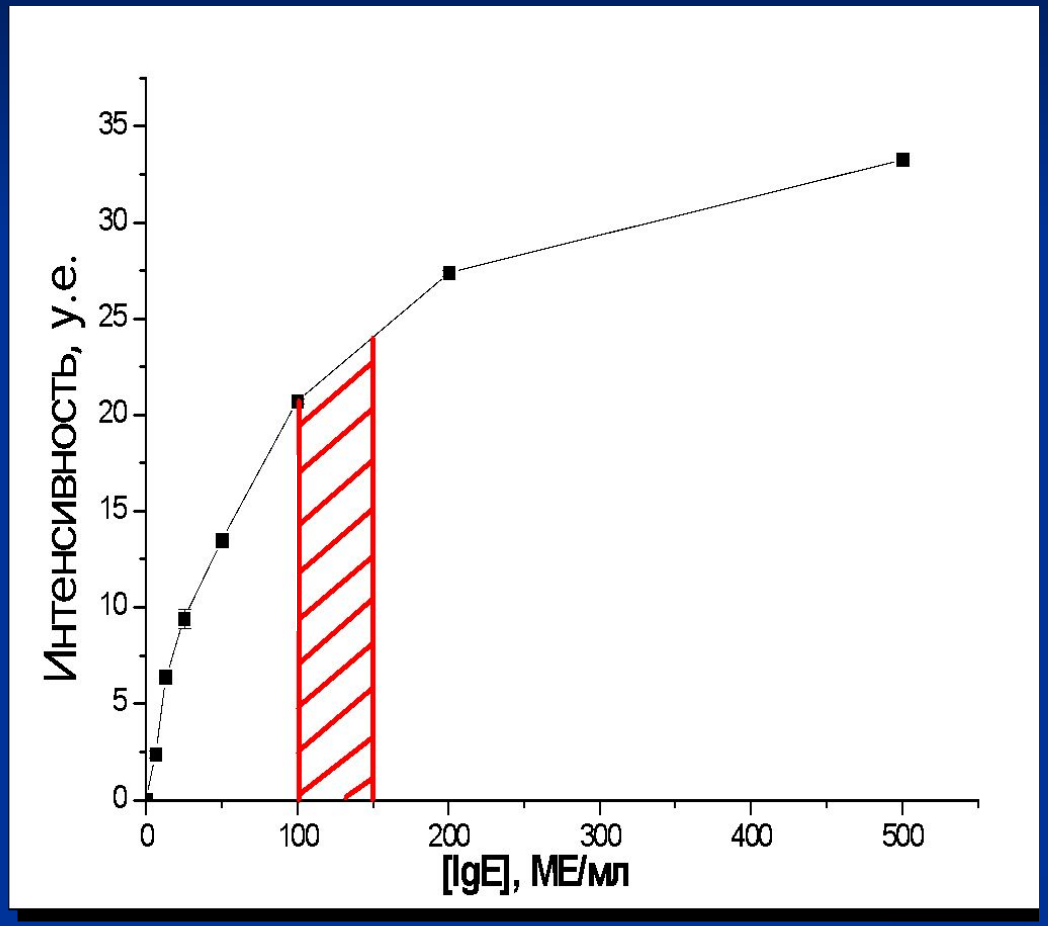
Cortez Diagnostics, US

ПОРТАТИВНЫЙ ПРИБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНТЕНСИВНОСТИ ОКРАСКИ ЛИНИЙ фирмы “ESE GmbH” (Германия)

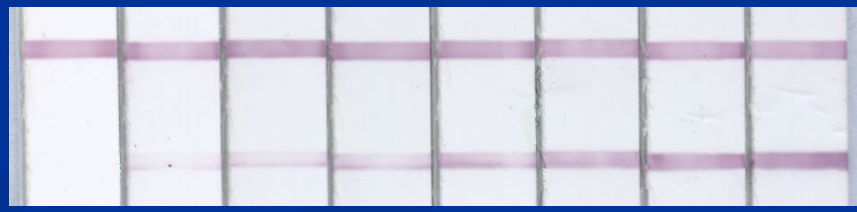
Прибор для регистрации интенсивности цвета тестовых линий фирмы «Микроанализ» (Россия)


25 1 2007

Характеристики разработанной тест-системы для определения общего IgE

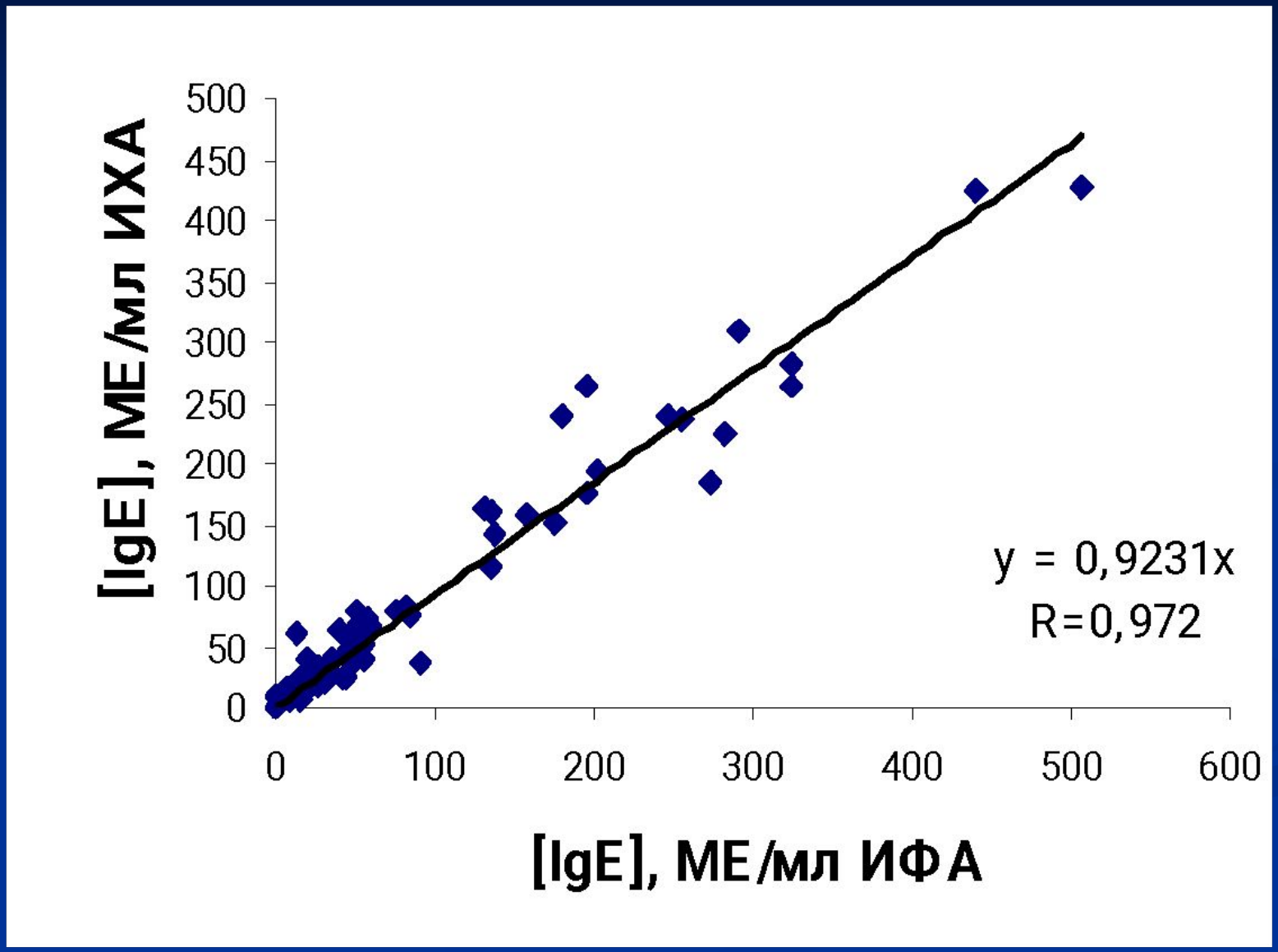


- ***Предел обнаружения:***
  5 МЕ/мл
- ***Диапазон определяемых концентраций*:**
  5 - 500 МЕ/мл
- ***Коэффициент вариации:***
  2-10%
- ***Время анализа*:**
  10 – 15 минут



0 6 12 25 50 100 200 500
МЕ/мл

Корреляция результатов определения концентраций общеі IgE в сыворотках крови методами ИФА и ИХА



ТЕНДЕНЦИИ РАЗВИТИЯ МЕТОДОВ ЛАТЕРАЛЬНОГО ПРОТОЧНОГО ИММУНОАНАЛИЗА

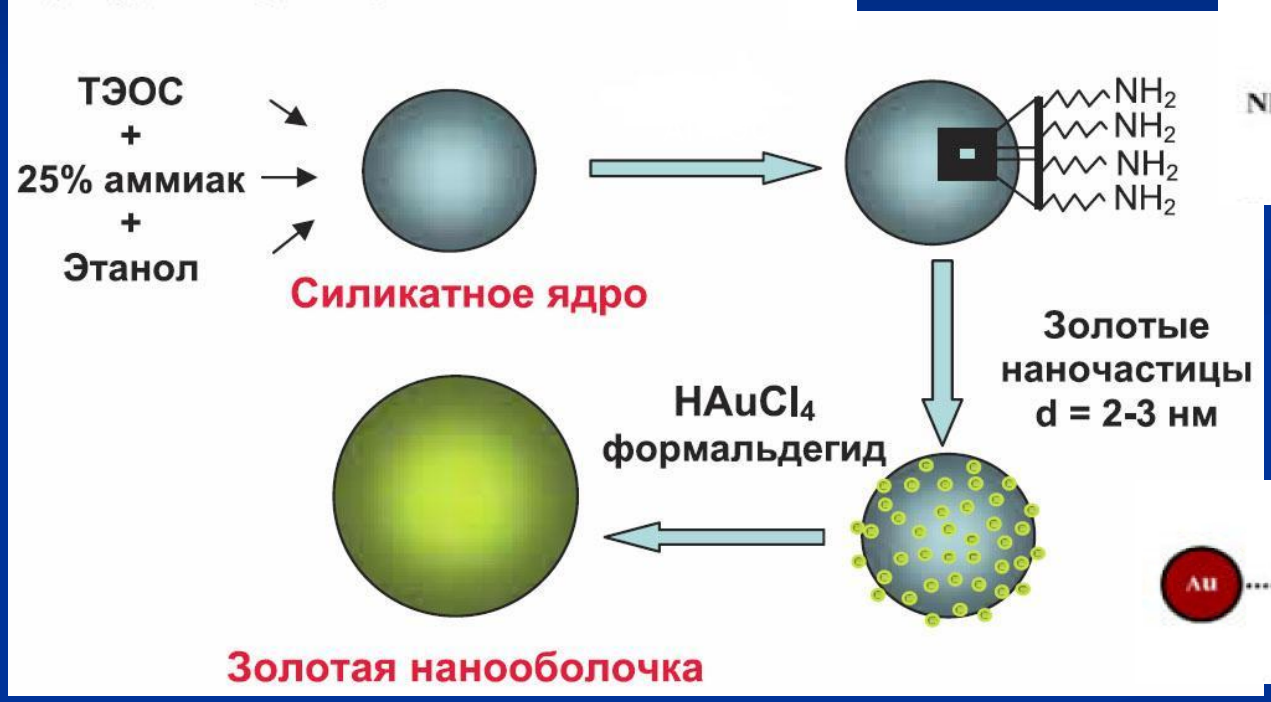
- Разработка количественных методов анализа
- Повышение чувствительности и воспроизводимости анализа
- Использование новых классов меток
- Разработка мультикомпонентных систем анализа
- Разработка новых платформ проведения анализа
- Уменьшение стоимости

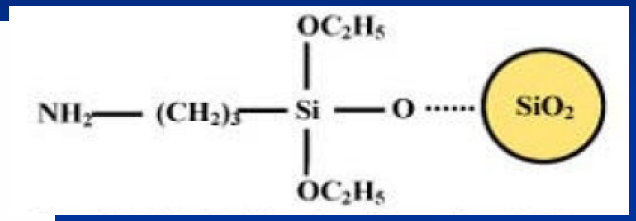
Типы визуальных меток для быстрых тестов

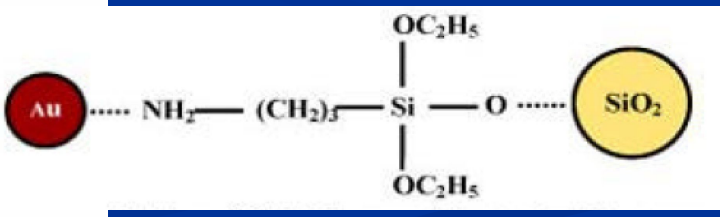
- наночастицы золота
- наносферы (nanospheres)
- квантовые точки (Quantum dots, QD)

Основные этапы синтеза золотых нанооболочек с ядром из диоксида кремния (40-500 нм)

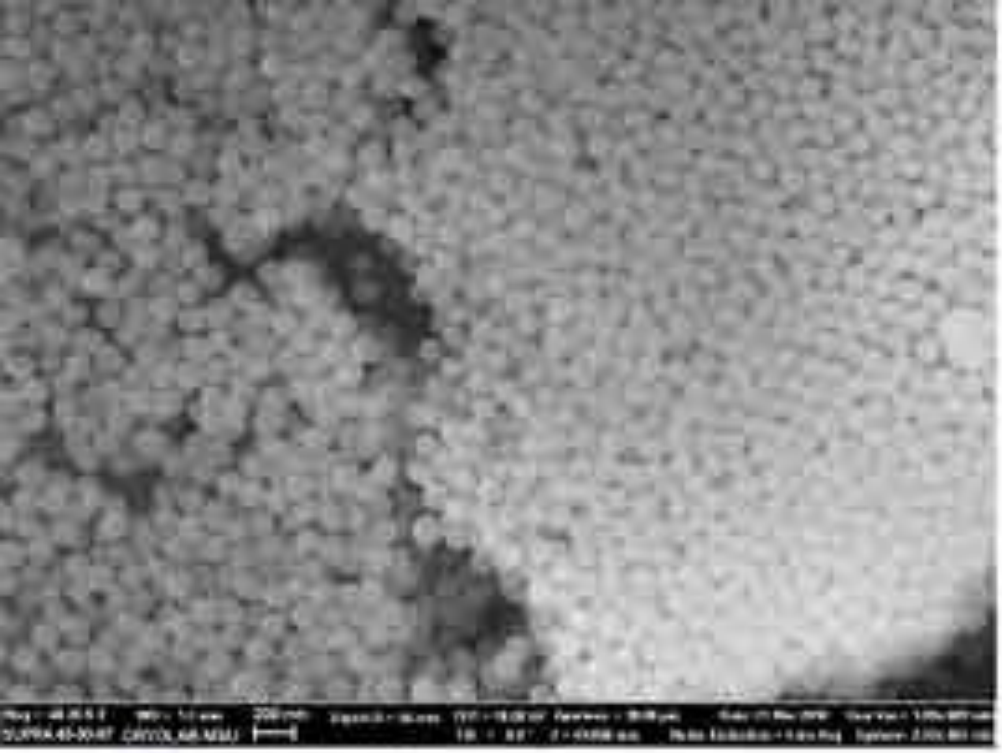
$$\left.\begin{array}{l} Si(OC_2H_5)_4 + 4H_2O \rightarrow Si(OH)_4 + 4C_2H_5OH \\ Si(OH)_4 \rightarrow SiO_2 + 2H_2O \end{array}\right\} \quad (1)$$

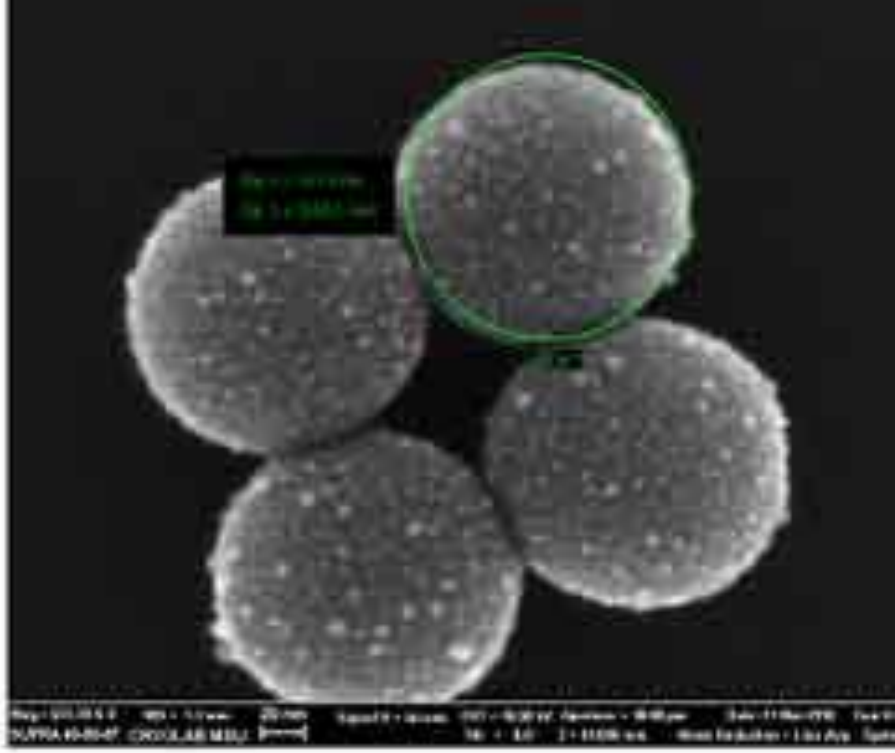




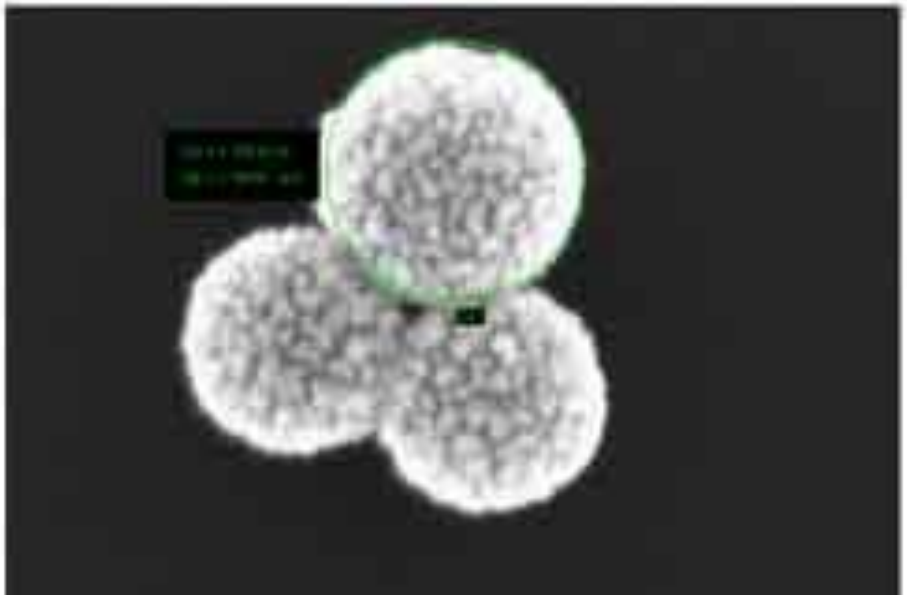


ТЭОС – тетраэтилортосиликат
АПТЭС – 3-аминопропилтриэтоксисилан

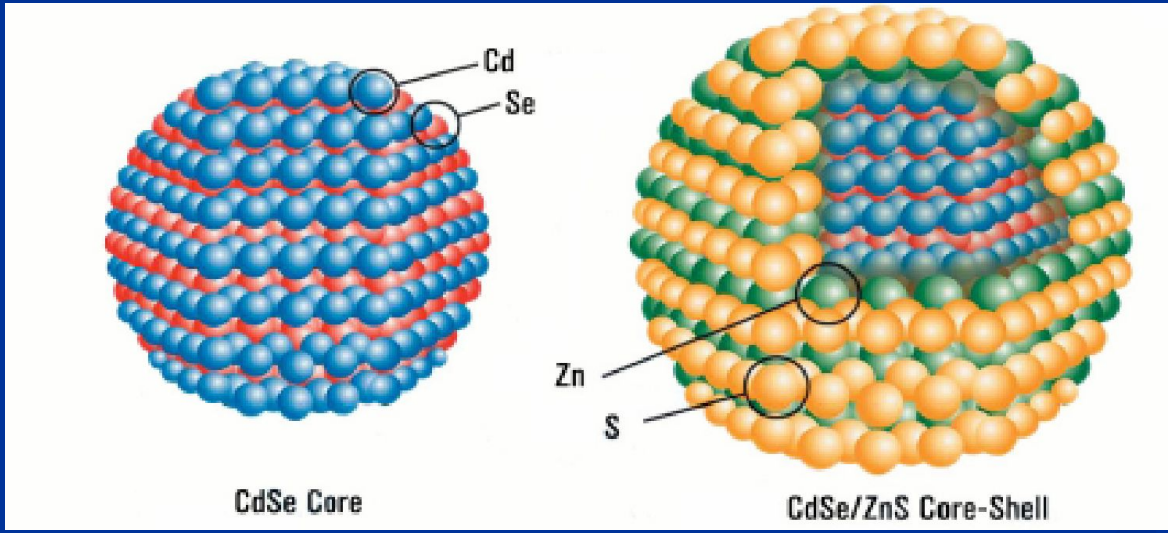




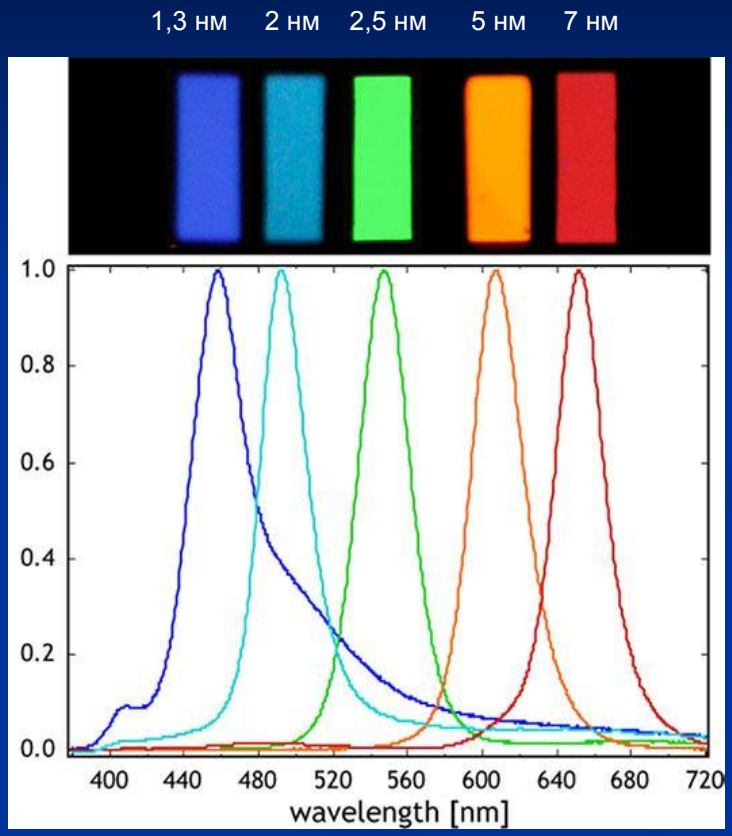
Наноагрегаты



КВАНТОВЫЕ ТОЧКИ



Спектральные характеристики квантовых точек

Квантовые точки – CdSe/ZnS
CdTe/ZnS

Размер 1-10 нм