

ИММУНОЧИПЫ – НОВЫЙ ФОРМАТ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

*Чеканова Т.А., Маркелов М.Л., Пудова Л.А.,
Кирдяшкина Н.П., Гоптарь И.А., Судьина А.С.,
Андрюшина Т.А., Шипулин Г.А.*

*ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии»
Роспотребнадзора*

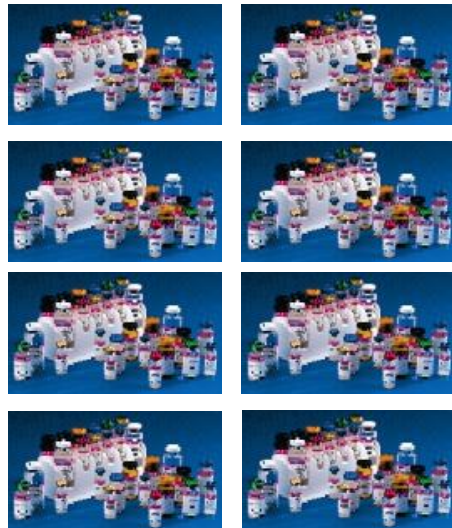
Разработка тест-систем в формате иммуночипа для диагностики инфекционных, аллергических и аутоиммунных заболеваний



ИФА

-	+
<ul style="list-style-type: none">- невозможно получить результаты по нескольким маркерам заболевания в одном анализе (различные протоколы, различные наборы),- высокая себестоимость для комплексной диагностики (несколько маркеров)	<ul style="list-style-type: none">- широко используется в клинической практике,- доступное оборудование,- разумная цена для единичного анализа

ИФА



VS

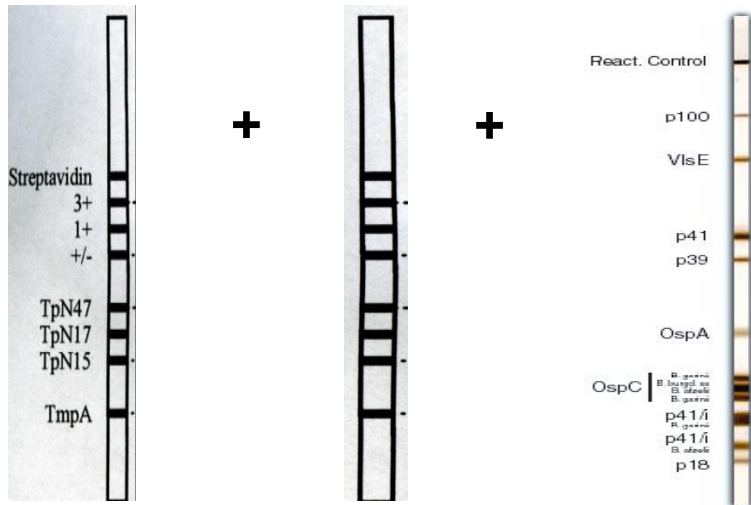


Иммуночип

Иммуноблот

-	+
<ul style="list-style-type: none">- невозможно получить результаты по нескольким инфекциям за один анализ (различные наборы),- очень высокая цена анализа,- субъективная интерпретация результатов	<ul style="list-style-type: none">- широко распространен в клинической практике,- не нуждается в специализированном оборудовании

Иммуноблот



Иммуночип



VS

Технологии не для каждой лаборатории

Evidence (RANDOX)

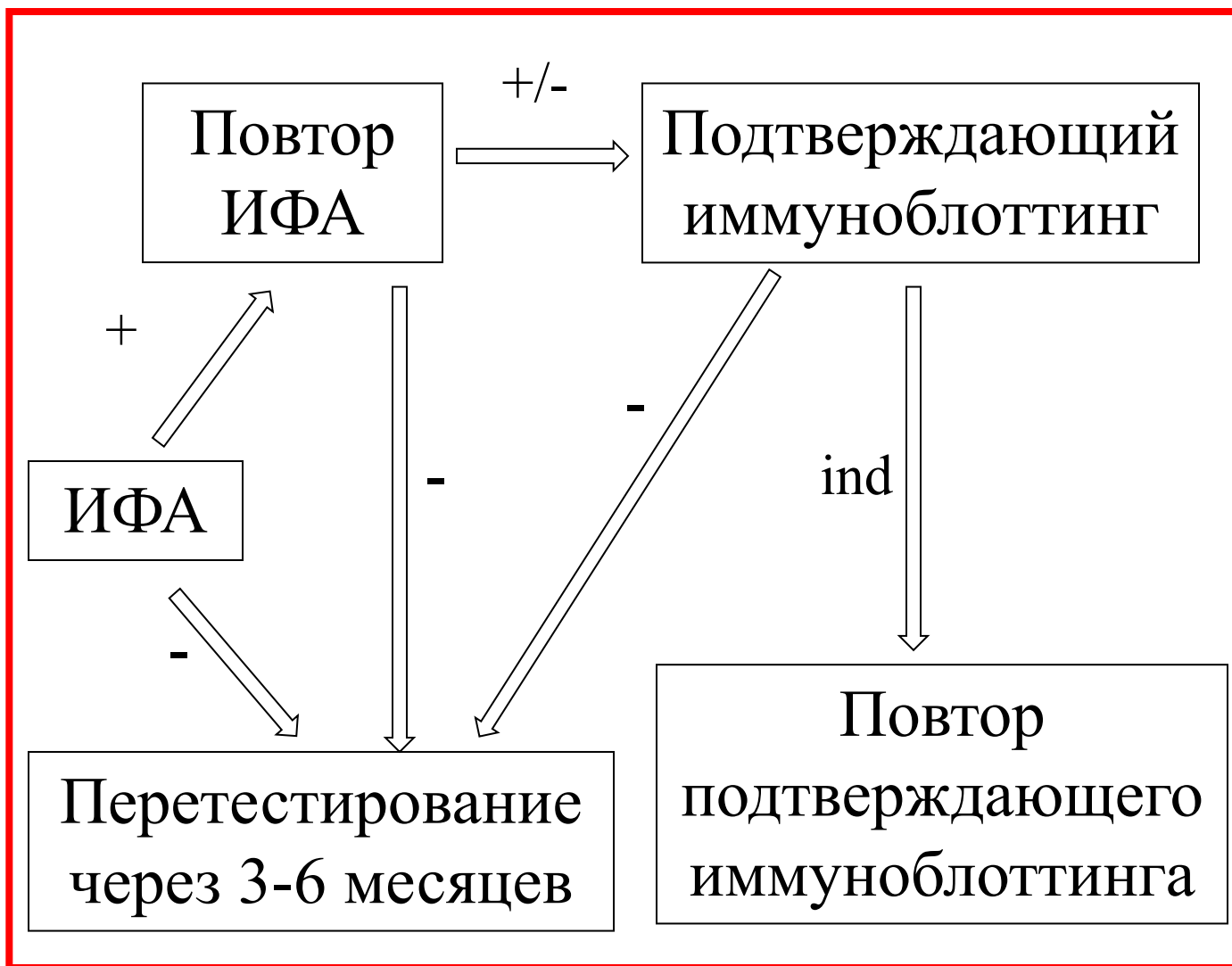


BioPlex (BIO-RAD)



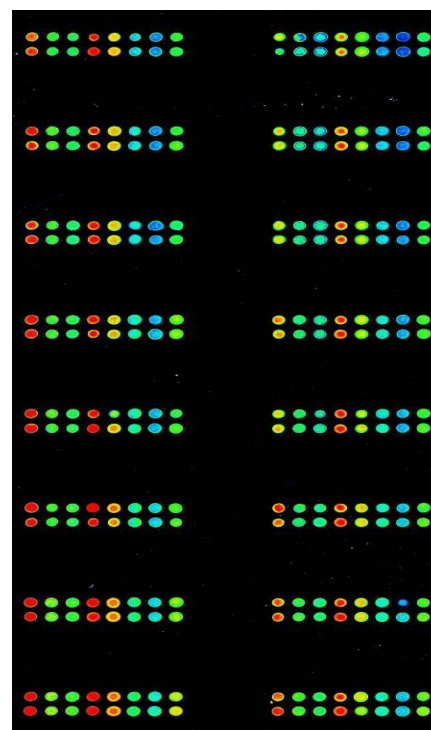
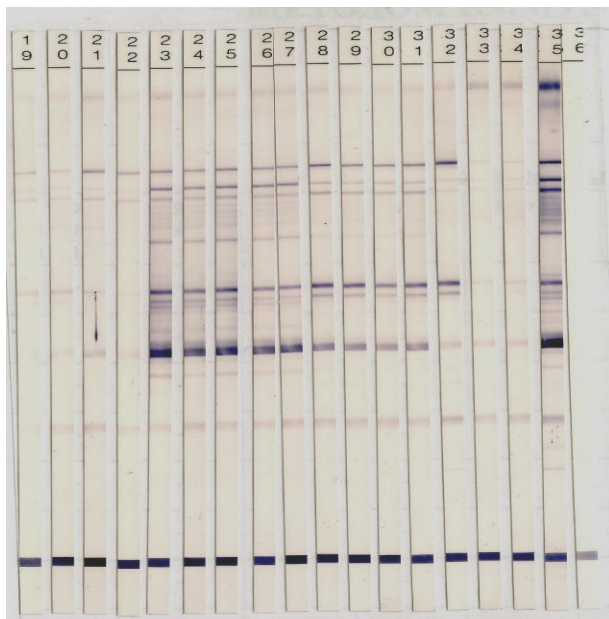
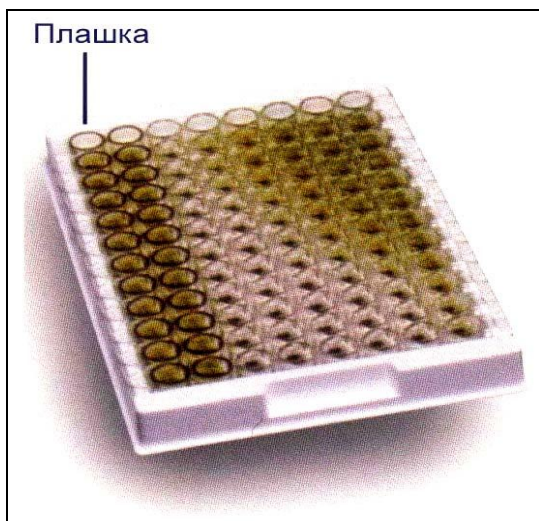
+	-
Автоматическое процессирование	Очень дорогие тест-системы и оборудование
Мультиплексность анализа (до 500 параметров)	Дорогое техническое обслуживание

В основу современного алгоритма серологической диагностики заложена необходимость проведения повторного тестирования для верификации результатов анализа



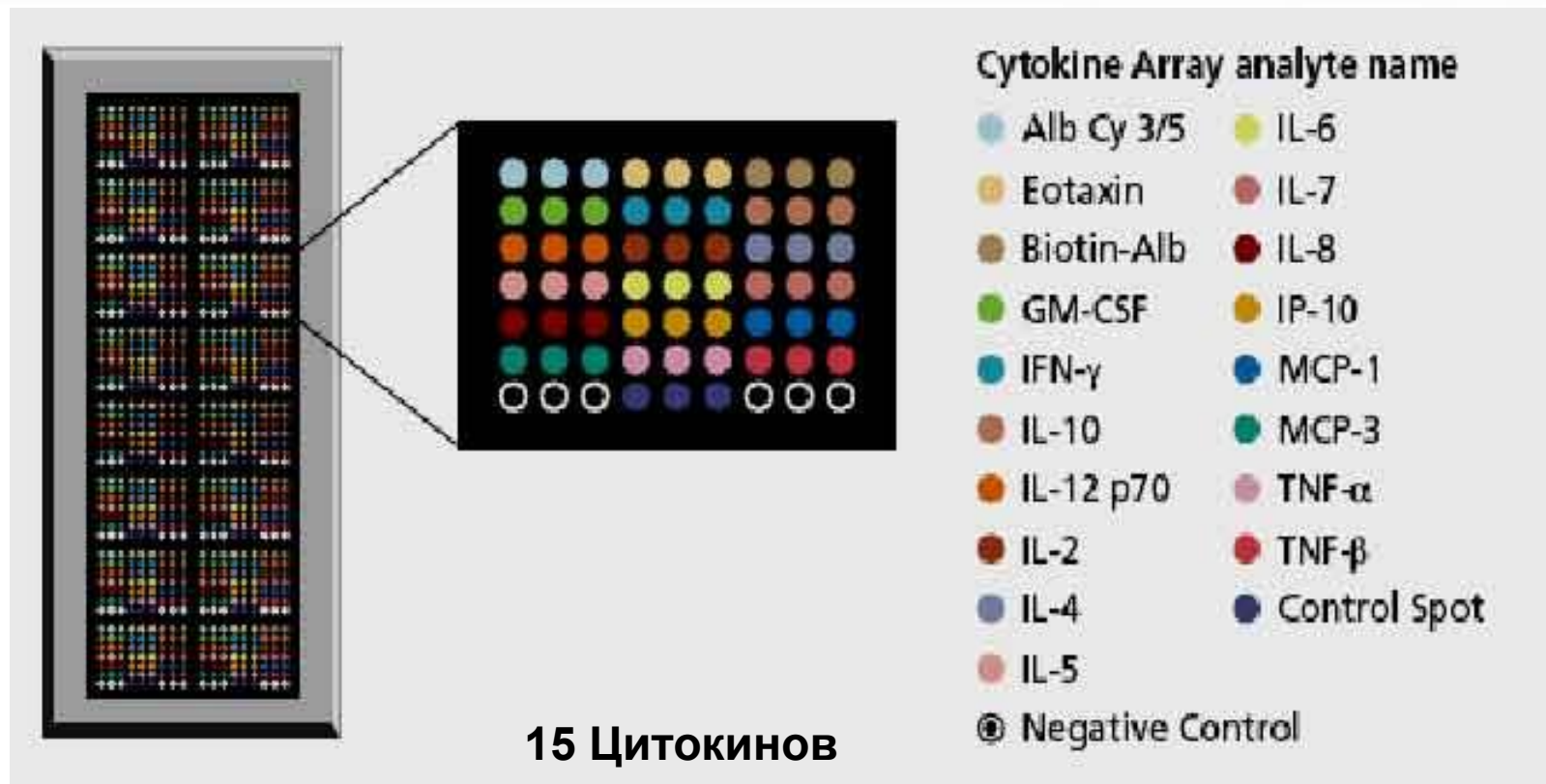
Иммуночип

- одноэтапный тест для выявления большого числа значимых биологических маркеров заболеваний,
- высокая информативность,
- возможность сочетания скрининга и подтверждения в одном формате

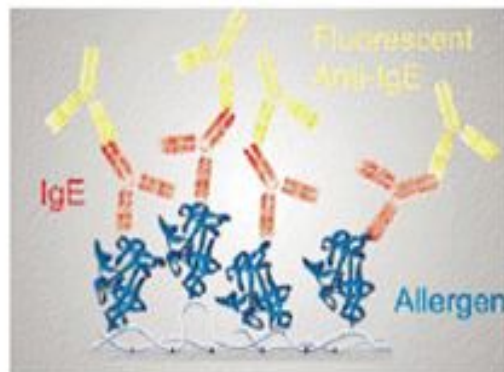
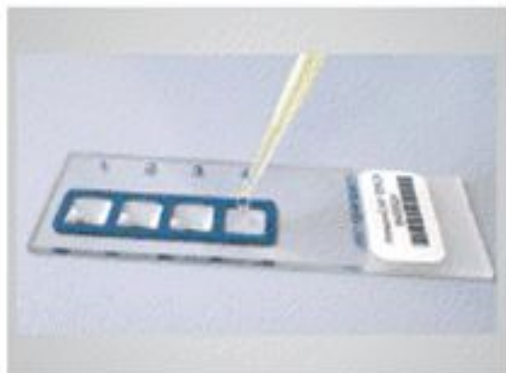


сопоставимый (или >) по чувствительности с ИФА, а по специфичности с иммуноблотом

Принципиальное отличие биочипов – возможность выявления в одном анализе множества маркеров

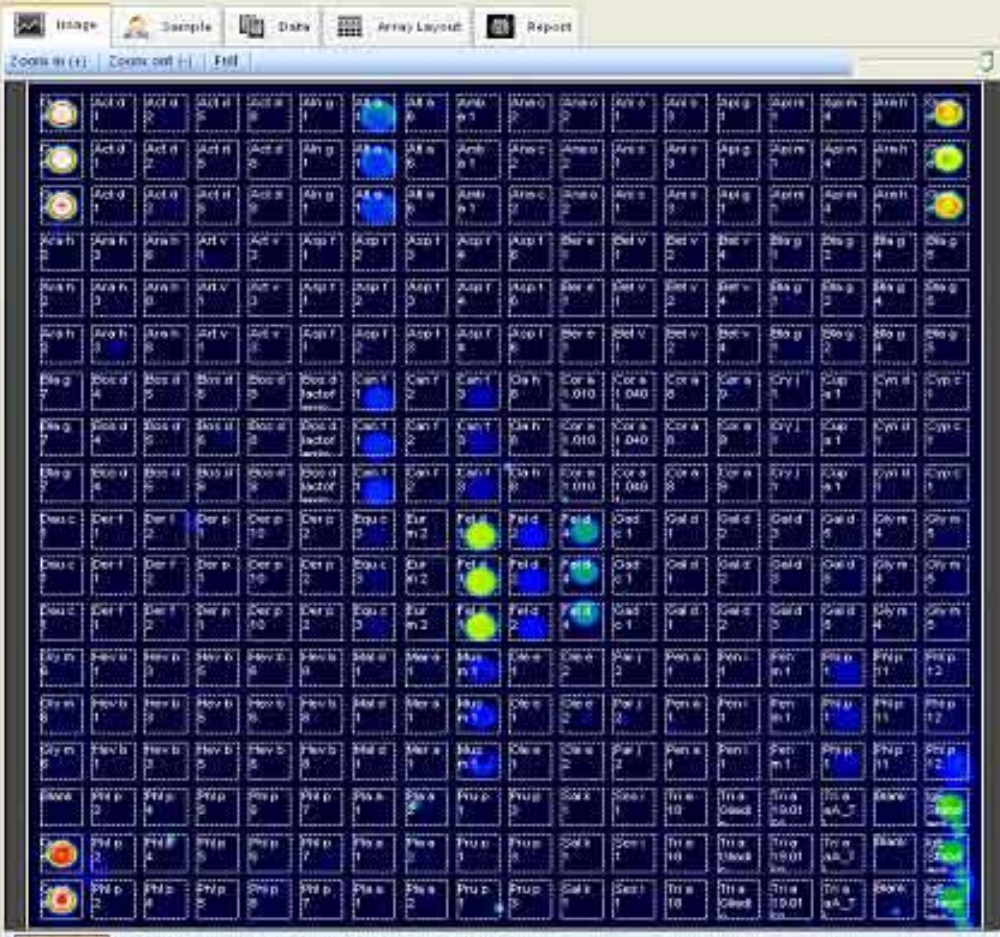


Аллергочип ImmunoCAP ISAC IgE



Общее время проведения реакции на чипе – около 5 часов
Минимальное количество образца – 20 мкл на 103 аллергена
Простота постановки

- Load results
- Scan images
- Load images
- Results
- Calibration
- Export
- Shut down

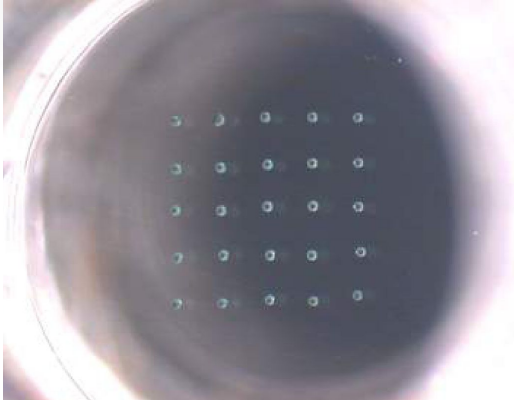


ID	Barcode	Pos	Sample Code
M.D.	OB11924	1	OB11924_1
OB	OB11924	2	OB11924_2
OB	OB11924	3	OB11924_3
OB	OB11924	4	OB11924_4
Failed	OB12024	1	OB12024_1
Failed	OB12024	2	OB12024_2
Failed	OB12024	3	OB12024_3
Failed	OB12024	4	OB12024_4
Failed	OB12124	1	OB12124_1
Failed	OB12224	2	OB12224_2
Failed	OB12224	3	OB12224_3
Failed	OB12224	4	OB12224_4
Failed	OB12224	1	OB12224_1
Failed	OB12224	2	OB12224_2
Failed	OB12224	3	OB12224_3
Failed	OB12224	4	OB12224_4
OB	OB12524	1	OB12524_1
OB	OB12524	2	OB12524_2
M.D.	OB11924	1	OB11924_1
OB	OB12224	4	OB12224_4

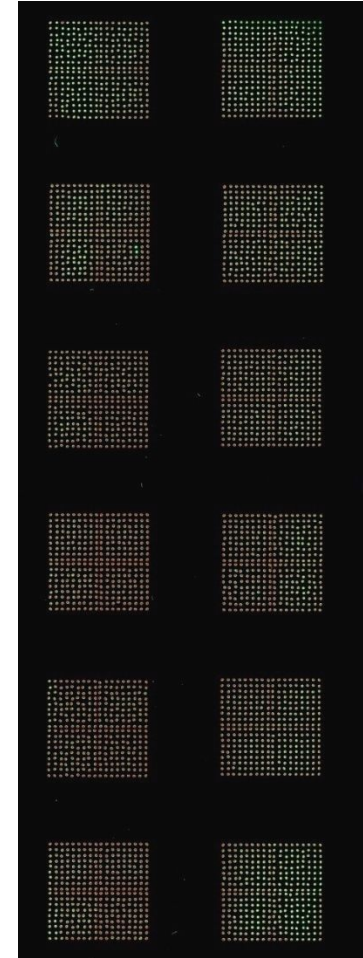
Method: Specificity:

Finish

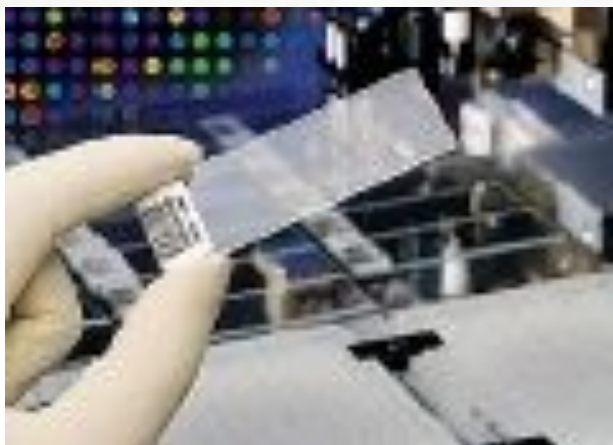
Новая технология бесконтактной микропечати с помощью современных наноплоттеров



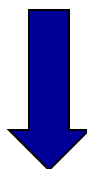
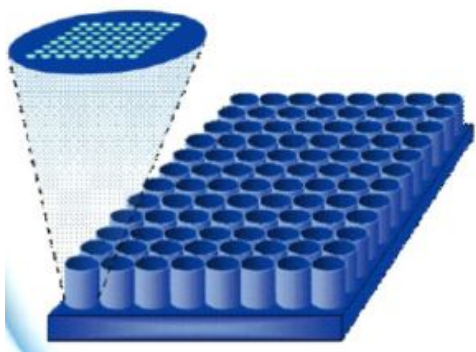
*Позволяют печатать
на слайды или дно лунок
планшетов*



1 чип (слайд) = 1 образец



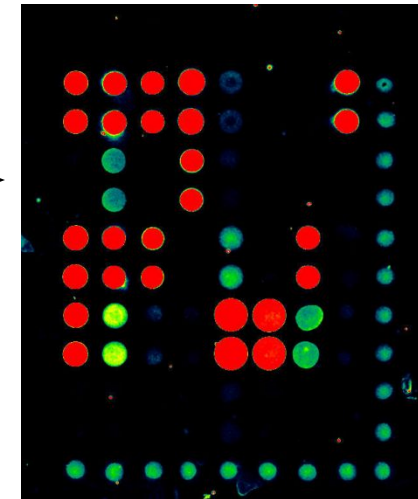
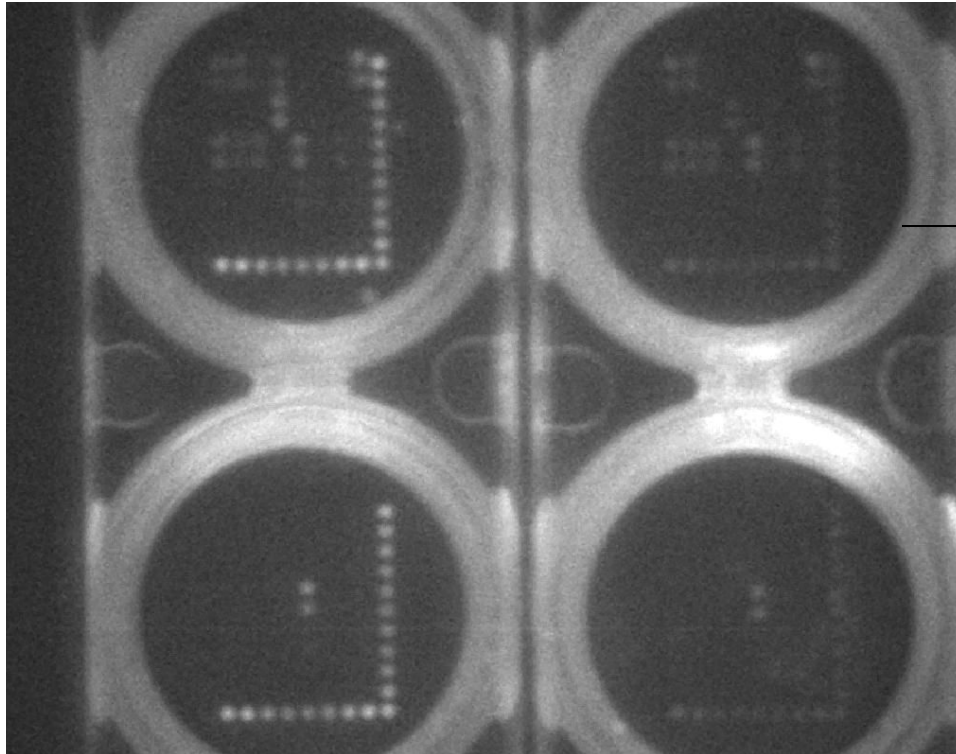
1 слайд = 16 образцов, $16 \times 4 = 64$ образца



1 планшет = 96 образцов



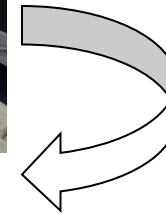
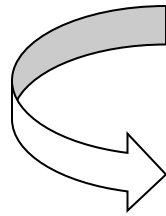
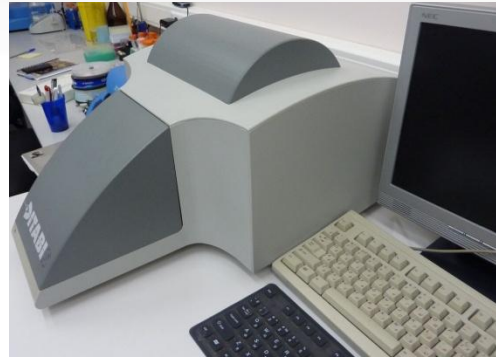
Иммуносорбенты для планарных чипов высокой плотности – активированные микроскопные слайды и полистироловые планшеты



Флуоресцентный профиль
эрея на альдегидном слайде

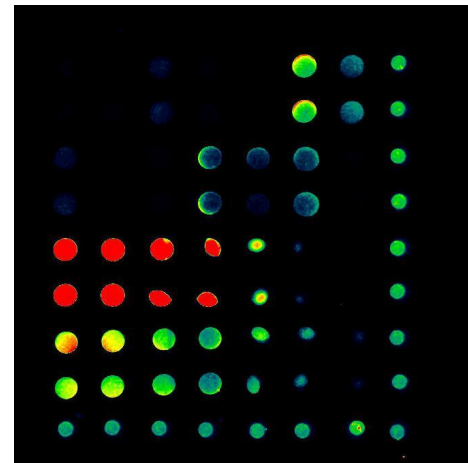
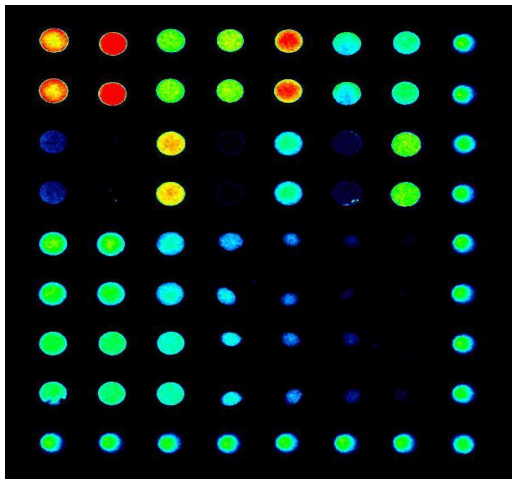
Эрей – лунка планшета

Детекция антител разных классов в одной постановке в одном эррее



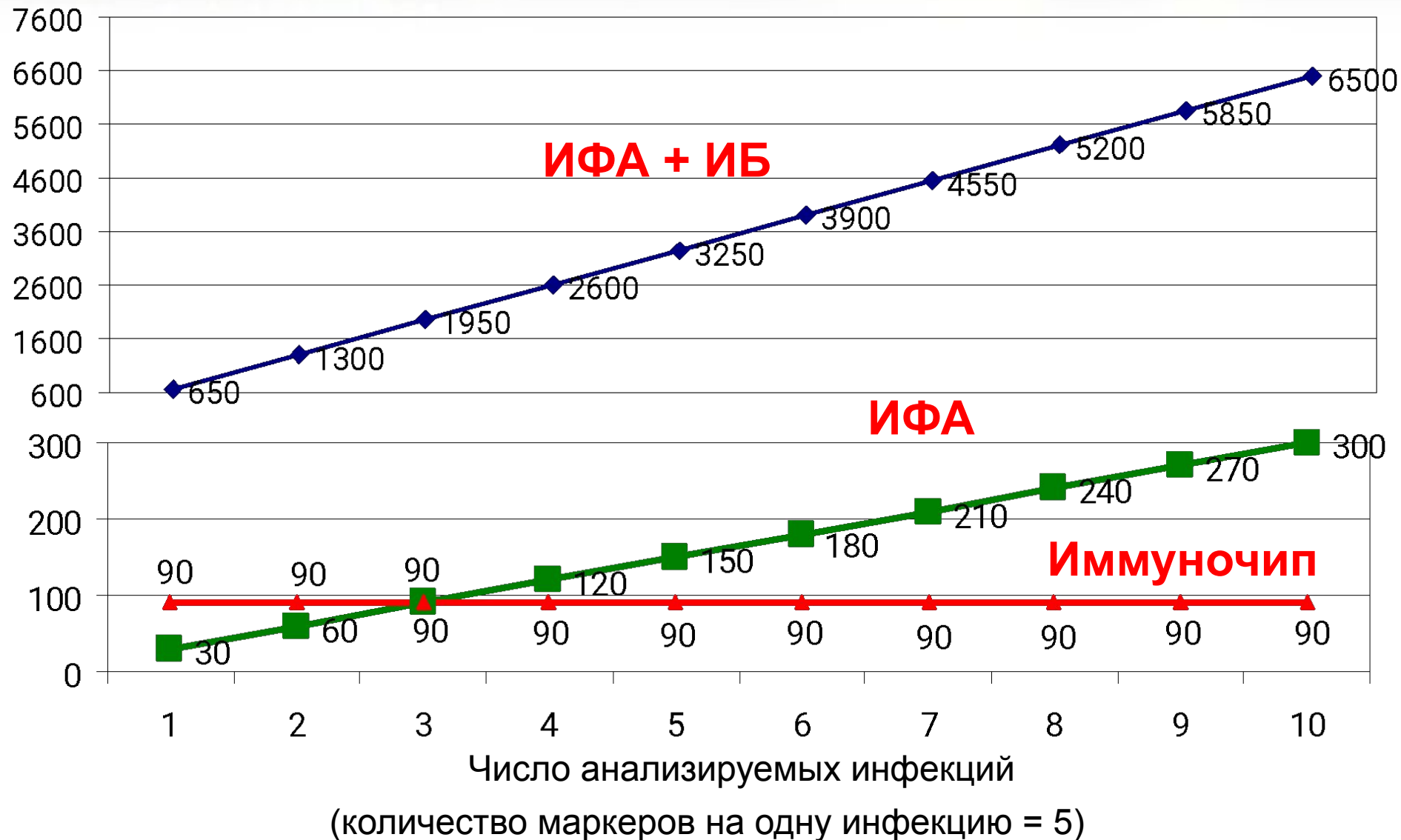
КАНАЛ Cy5
(антитела IgG)

КАНАЛ Cy3
(антитела IgM)




Себестоимость анализа при использовании разных серологических методов

руб



Принципы размещения антигенов и антител на одном иммуночипе

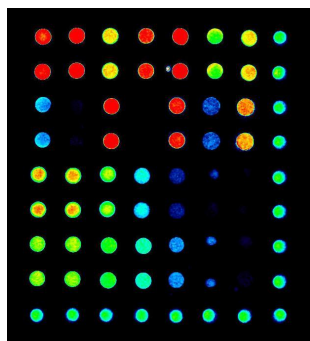
<p>Микроорганизмы, имеющие перекрестно-реагирующие антигены</p>	<p>Инфекции, вызываемые патогенными спирохетами</p>	 <p>ASM Microbiolibrary.org © Nelson</p>
<p>Микроорганизмы, имеющие одинаковые пути передачи</p>	<p>Трансфузионные инфекции</p>	
<p>Микроорганизмы, вызывающие сходную патологию</p>	<p>АФС, ToRCH-инфекции</p>	<ul style="list-style-type: none">• T. gondii• Rubella virus• CMV• HSV2• HSV1 
<p>Микроорганизмы, эндемичные для региона, в котором планируется использовать иммуночип</p>	<p>Арбовирусные инфекции</p>	



**ТЕСТ-СИСТЕМЫ
В ФОРМАТЕ ИММУНОЧИПОВ,
РАЗРАБАТЫВАЕМЫЕ В ЦНИИЭ**

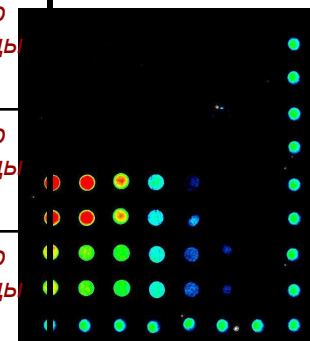
Дизайн эррея иммуночипа для серодиагностики Лайм-боррелиоза

+



p100 B.gar.	p100 B.afz	VisE B.gar.	VisE B.afz	p58 B.afz.	p41 B.gar	p41 B.afz	маркер границы эррея
p100 B.gar.	p100 B.afz	VisE B.gar.	VisE B.afz	p58 B.afz.	p41 B.gar	p41 B.afz	маркер границы эррея
p39 B.afz	BBK32 B.gar	BBK32 B.afz	OspC B.afz	OspC B.afz	p17 B.gar	p17 B.afz	маркер границы эррея
p39 B.afz	BBK32 B.gar	BBK32 B.afz	OspC B.afz	OspC B.afz	p17 B.gar	p17 B.afz	маркер границы эррея
Вспомогательные контроли (титрование IgG/IgM человека)							маркер границы эррея
Вспомогательные контроли в титровании (титрование IgG/IgM человека)							маркер границы эррея
Вспомогательные контроли в титровании (титрование анти- IgG/IgM человека)							маркер границы эррея
Вспомогательные контроли в титровании (титрование анти-IgG/IgM человека)							маркер границы эррея
маркер границы эррея	маркер границы эррея	маркер границы эррея	маркер границы эррея	маркер границы эррея	маркер границы эррея	маркер границы эррея	маркер границы эррея

-



Чувствительность и специфичность иммуночипа для серодиагностики ИКБ

(клинический материал предоставлен и охарактеризован клиническими базами: МОНИКИ, НИИР РАМН, Центрами санэпиднадзора - г. Ижевск, г. Киров, г.Ярославль, г. С.-Петербург)

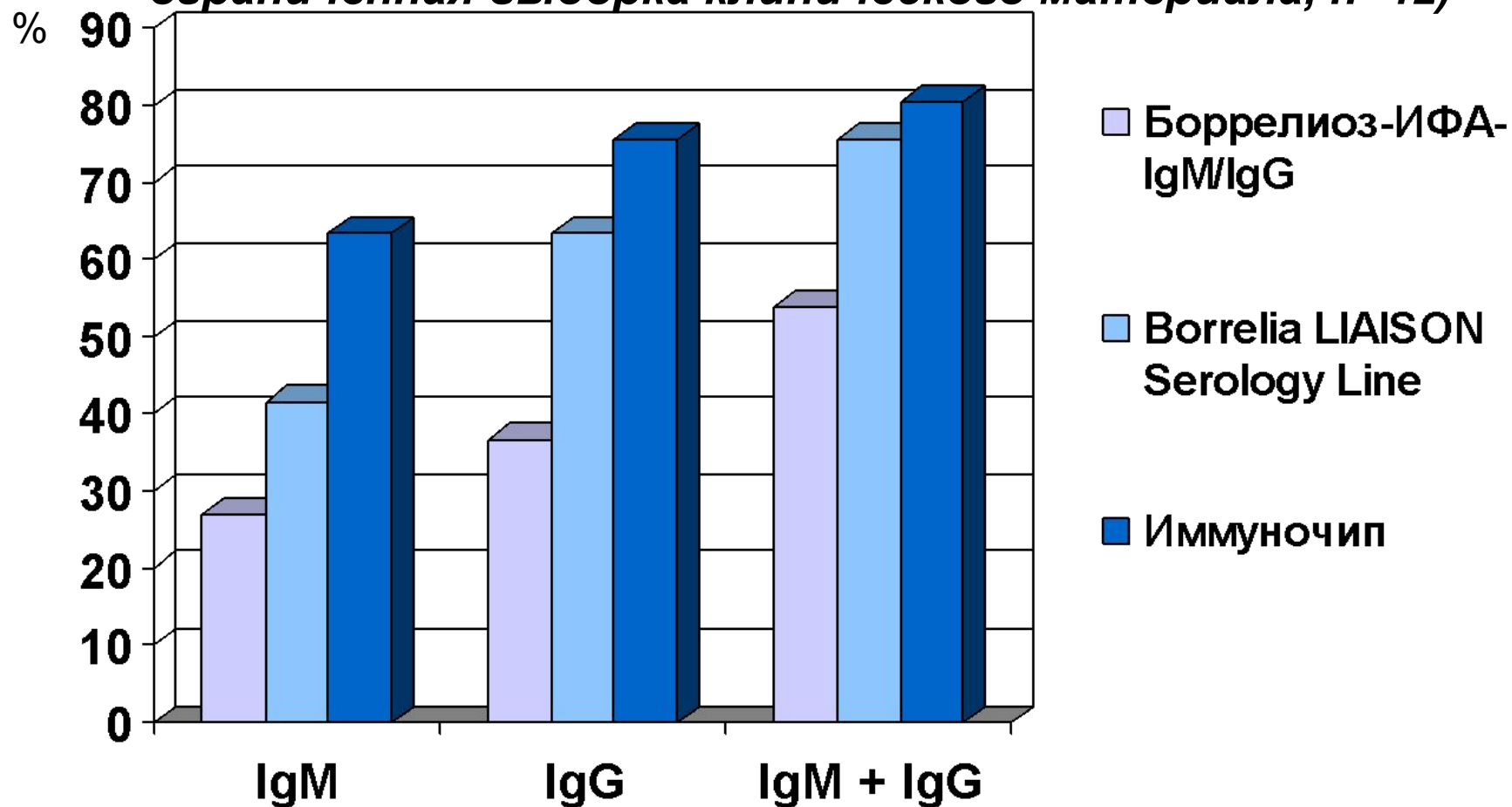
	IgM	IgG	IgM + IgG
1 стадия (n = 159)	60,1 %	48,6 %	87,3 %
2 + 3 стадии (n = 201)	55,7 %	88,6 %	97,1 %
специфичность (n = 495)	96,4%	97,2%	

Сравнительное изучение выявления специфических антител в сыворотках крови больных ИКБ

в различных тест-системах

(процент выявления антител,

ограниченная выборка клинического материала, n=42)



Изучение дискордантных образцов в иммуноблоте на наличие антител класса М

образец	иммуночип (спектр антител)	иммуноблот (количество баллов и спектр антител)
947-2	+ <i>VlsE B. afzelii</i> , <i>p41int B. afzelii</i> , <i>p17 B.afzelii</i>	- (4 балла) <i>p41int B. afzelii</i> , <i>p41int B. garinii</i>
989-3	+ <i>OspC B. garinii</i>	+ (8 баллов) <i>OspC</i>
902-2	+ <i>OspC B. garinii</i> , <i>OspC B. afzelii</i>	+ (8 баллов) <i>OspC</i>
903-1	+ <i>VlsE B. garinii</i> , <i>OspC B. garinii</i>	- (3 балла) <i>VlsE</i>
934-3	+ <i>p100 B. afzelii</i> , <i>p41 int B. afzelii</i> , <i>p39 B. afzelii</i> , <i>OspC B. garinii</i> , <i>p17 B. afzelii</i> , <i>p17 B. garinii</i>	+ (11 баллов) <i>VlsE</i> , <i>OspC</i>
945-2	+ <i>p41 int B. afzelii</i> , <i>p41 int B. afzelii</i> , <i>OspC B. afzelii</i> , <i>OspC B. garinii</i>	- (4 балла) <i>p41 int B.afzelii</i> , <i>p41 int B. garinii</i>
1319-2	+ <i>p41 int B. afzelii</i> , <i>p41 int B. afzelii</i> , <i>OspC B. afzelii</i> , <i>OspC B. garinii</i>	сомнительный (5 баллов) <i>p41</i> , <i>p41 int B.afzelii</i> , <i>p41 int B. garinii</i>

Инфекции передаваемые клещами рода Ixodes

F.tularensis

Tick-borne
encephalitis
virus

Babesia

Ehrlichia
muris,
chaffeensis



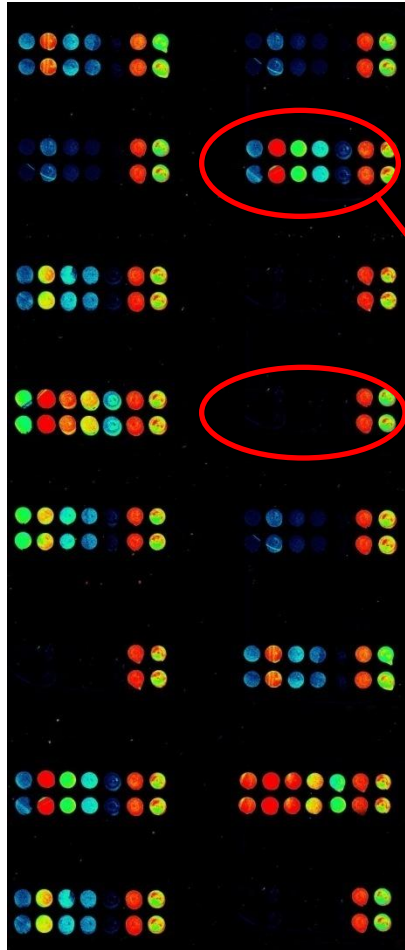
B.
burgdorferi s.l

Rickettsia

Anaplasma
phagocytophilum

C.burnetii

Иммуночип для выявления спектра трепонемоспецифических и реактивных антител классов G и M, ассоциированных с сифилисом



Тр 47	Тр 17	Тр 47	ТрpA	кардио липид	K1	K2
2,06	16,1	4,84	3,45	1,56	10,0	7,98
0,86	0,59	0,65	0,67	0,45	10.5	7,34



Результаты изучения чувствительности и специфичности иммуночипа для диагностики сифилиса

Сыворотки	Кол-во	Кол-во полож.	Кол-во отрицат.	Кол-во н/о
от пациентов с положительной реакцией на сифилис в рефер. т/с.	600	595	-	5
из панели МБС (полож.)	18	18	-	-
из панели МБС (отриц.)	8	-	8	-
от больных Лайм-боррелиозом	150	-	150	-
от больных лептоспирозом	50	-	50	-
с высоким содержанием РФ-фактора	20	-	20	-
от «здоровых» доноров	880	1	878	1

Иммуночип для серодиагностики TORCH-инфекций

- Одновременное выявление антител разных классов при использовании смеси конъюгатов (анти-IgG, - IgM, - IgA), меченых флуорофорами, отличающимися по спектральным характеристикам)
- Одновременное выявление антител к разным инфекциям на одном стекле



1 иммуночип на комплекс TORCH = 16 ИФА-тест-систем

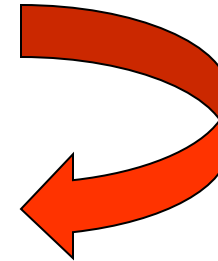
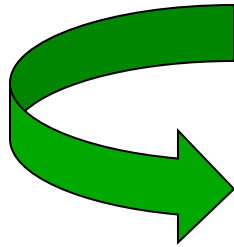
Флуоресцентная детекция спектра антител разных классов: IgG и IgM

Канал Cy3

Канал Cy5

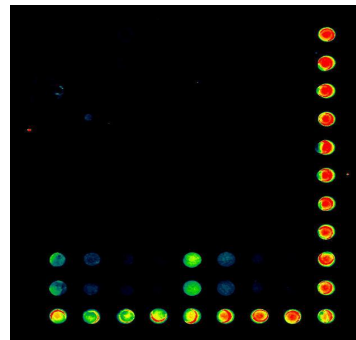
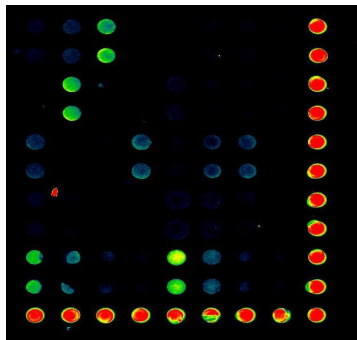
конъюгат анти-IgM человека-Cy3

+ конъюгат анти-IgM человека-Cy3



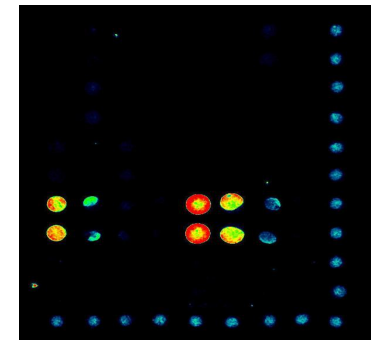
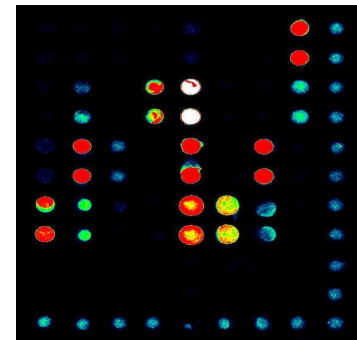
+

-



+

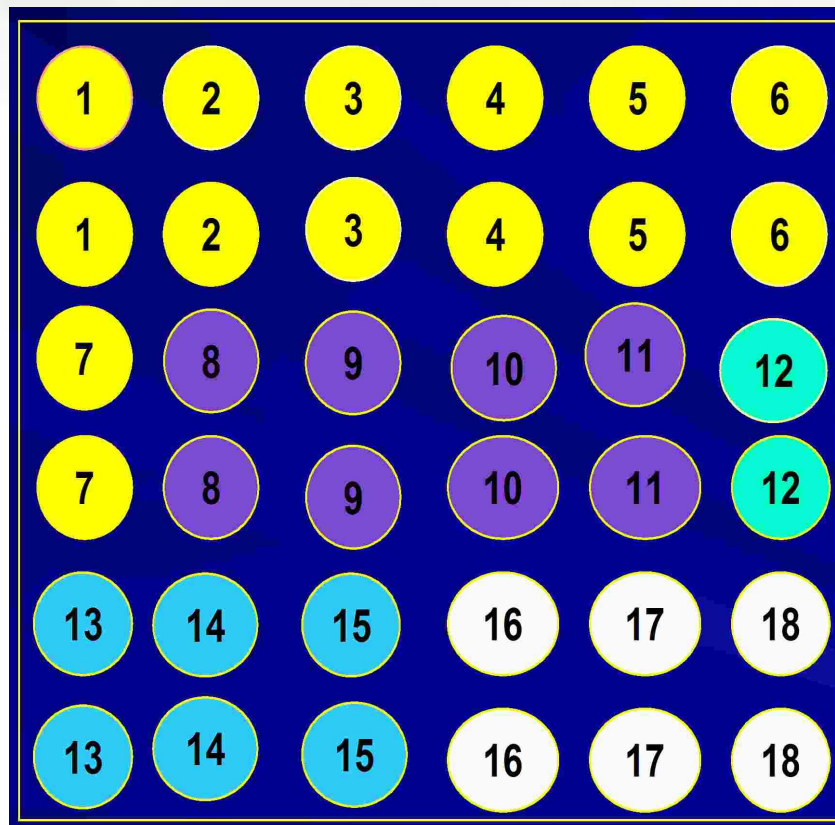
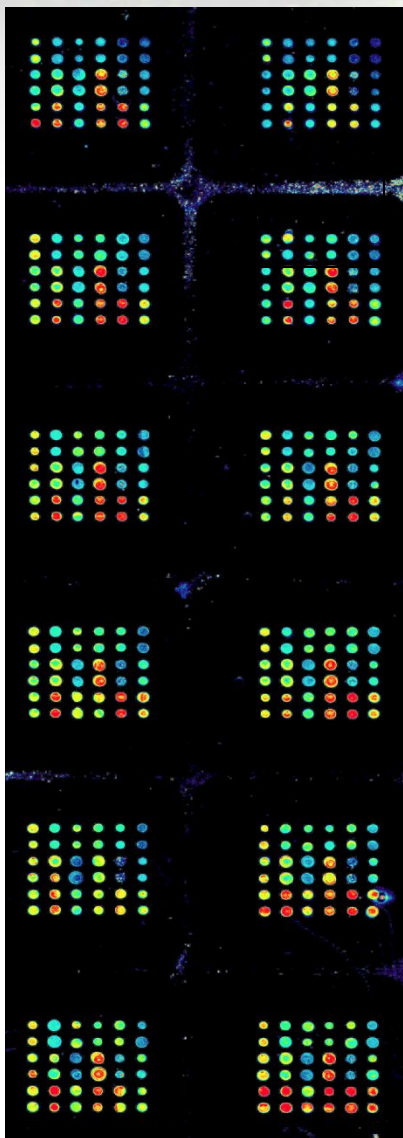
-



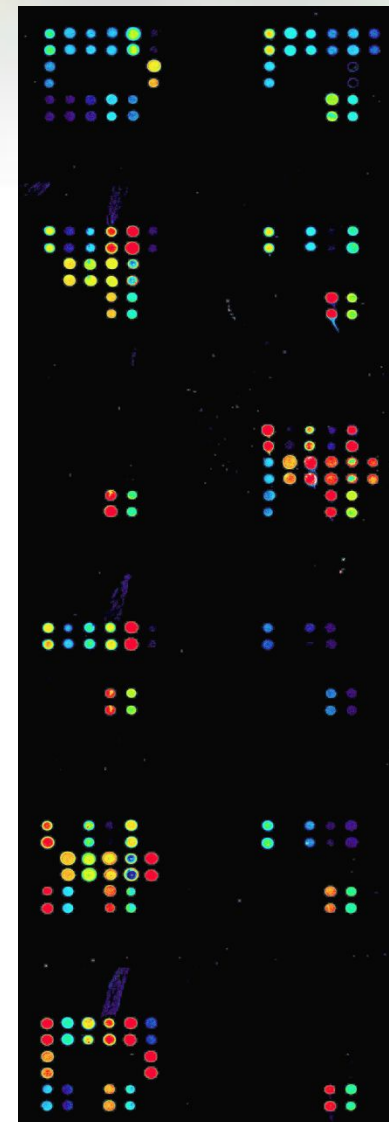
**Совпадение результатов, полученных в иммуночипе,
с данными ИФА при тестировании сывороток
(всего- 700 шт)**

Комплекс ToRCH- инфекций	% совпадения	
	по положительным сывороткам	по отрицательным сывороткам
T.gondii	97,6	97,6
CMV	97,6	100
HSV-1,2	97,6	97,7
Rubella	94,3	97,5
EBV	92,4	95,2

Определение значимых маркеров к ВИЧ 1 и 2 типов, ВГС, сифилису



gp120, gp160, gp41, pol, gag, env(ВИЧ2),
 AT p24, core, NS3, NS4, NS5, Tr47,
 Tr17, Tr15, TmpA, IgG, анти-IgG, буфер



Канал учета
 специфической
 реакции – Cy5

Канал внутреннего
 контроля - FITC

Оценка чувствительности иммуночипа «ВИЧ-ВГС-сифилис» (n = 1290 образцов)

Исследуемые образцы	Кол-во	Кол-во ВИЧ-положительных образцов	Кол-во анти-ВГС-положительных образцов	Кол-во образцов содержащих, антитела к сифилису
- от больных сифилисом	385	41	35	380 (5 – н/о)
- ОСО ВИЧ-1(+)	16	16	0	0
- ОСО ВИЧ-2 (+)	8	8	0	0
- ОСО ВГС (№№1-16 +)	16	0	16	0
- от больных ВГС	400	56	392 (8 – н/о)	22
- от ВИЧ-инфицированных	465	461 (4 – н/о)	188	45
Чувствительность, %		99.1	98.0	98.7

Оценка специфичности иммуночипа «ВИЧ-ВГС-сифилис» (n = 678 образцов)

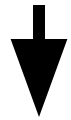
Исследуемые образцы	Кол-во	Кол-во ВИЧ-положительных образцов	Кол-во анти-ВГС-положительных образцов	Кол-во образцов содержащих, антитела к сифилису
- от практически здоровых доноров	400	1	2	2
- ОСО ВИЧ (-)	20	0	0	0
- ОСО ВГС (№№ 17-24 -)	8	0	0	0
- от лиц с аутоиммунными заболеваниями	50	1	2	1
- от инфекционных больных другой этиологии	200	2	1	3
Специфичность, %		99,4	99.3	99.1

Иммуночип для детекции ООИ (*B.anthraxis*, *Y.pestis*)

(ФЦП «Национальная система химической и биологической безопасности РФ»)

для *B.anthraxis*

для детекции
Y.pestis



Ab

Ab

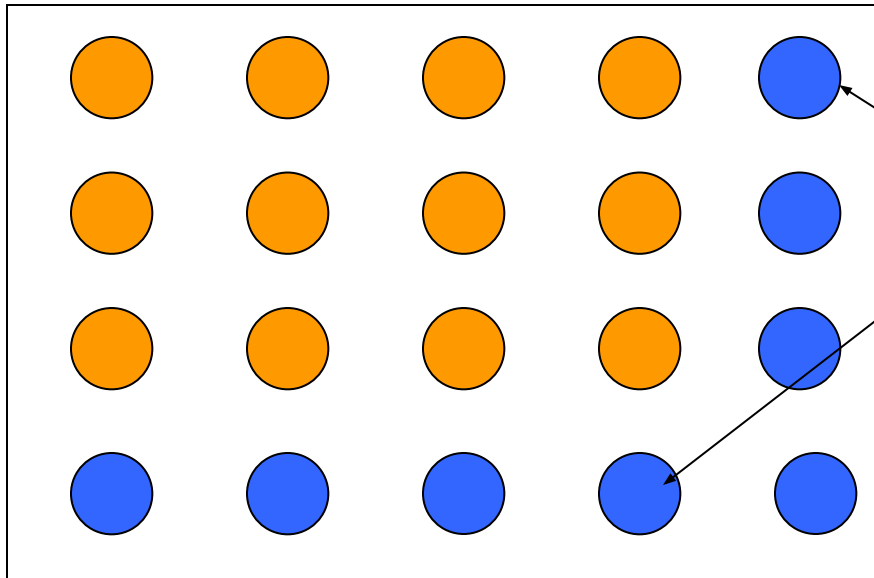
К -

SA26

IgG F1

К -

Один эррей

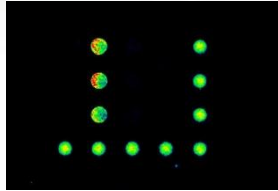


BSA-Cy5

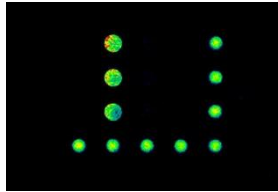
Примеры флуоресцентных паттернов. Аналитическая чувствительность

B. anthracis

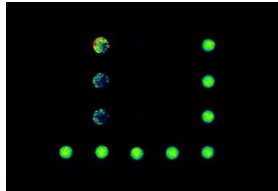
10^7 cells/ml



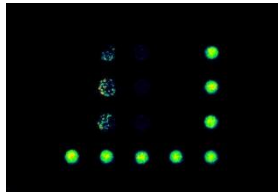
10^6 cells/ml



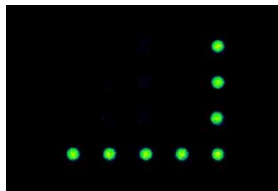
10^5 cells/ml



10^4 cells/ml

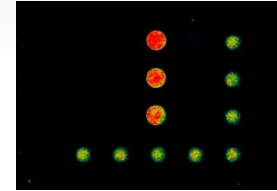


10^3 cells/ml

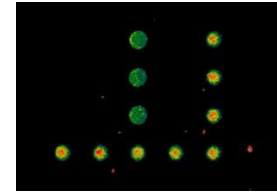


Y. pestis

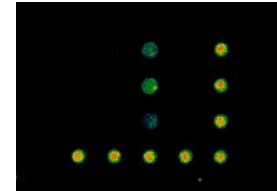
10^7 cells/ml



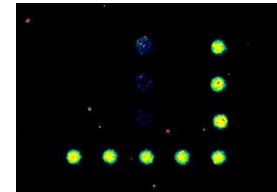
10^6 cells/ml



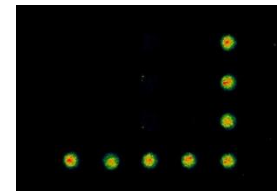
10^5 cells/ml



10^4 cells/ml



10^3 cells/ml



ДНК-чип для детекции *B.anthraxis*, *Y.pestis*, *F.tularensis*

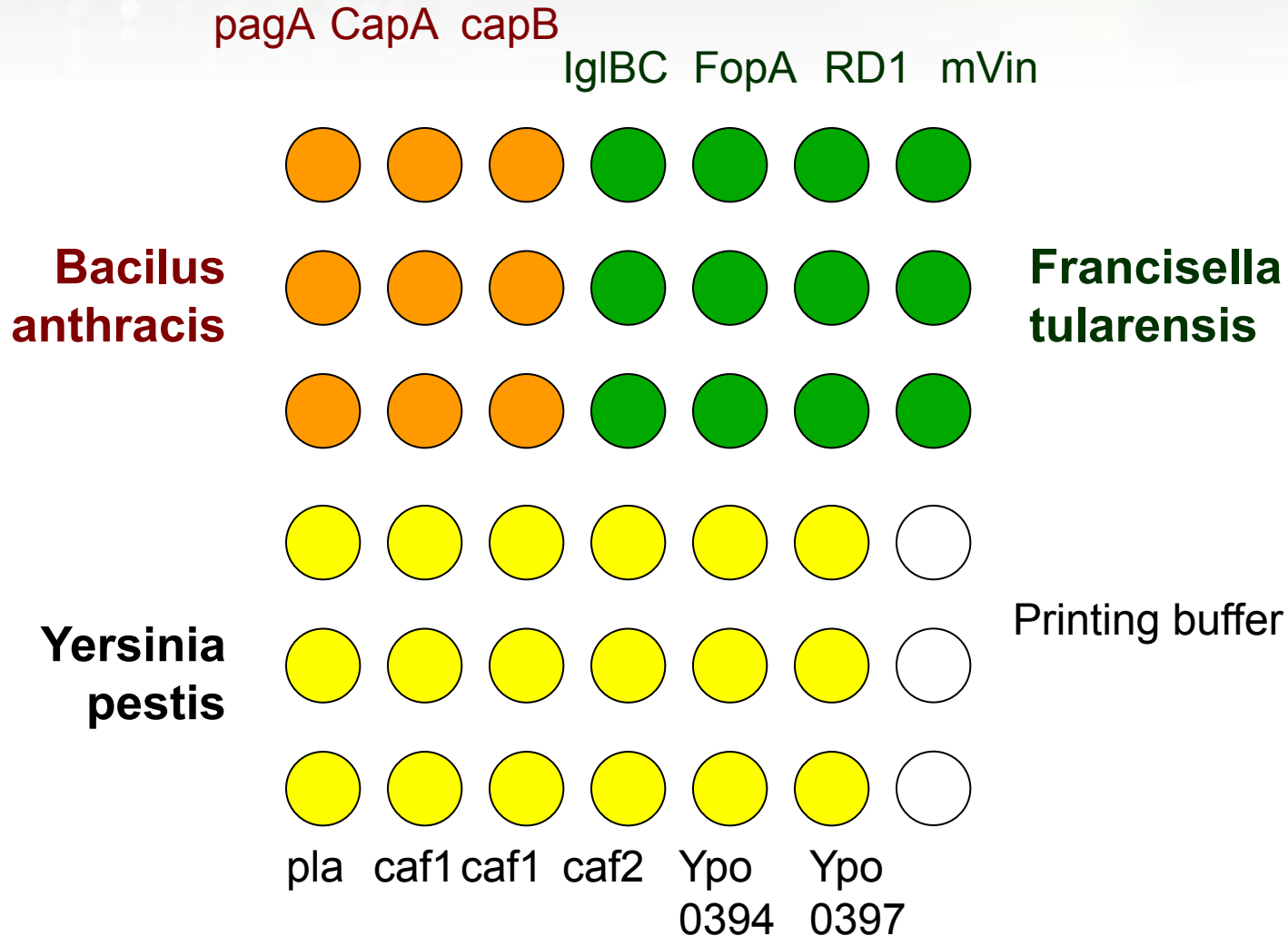
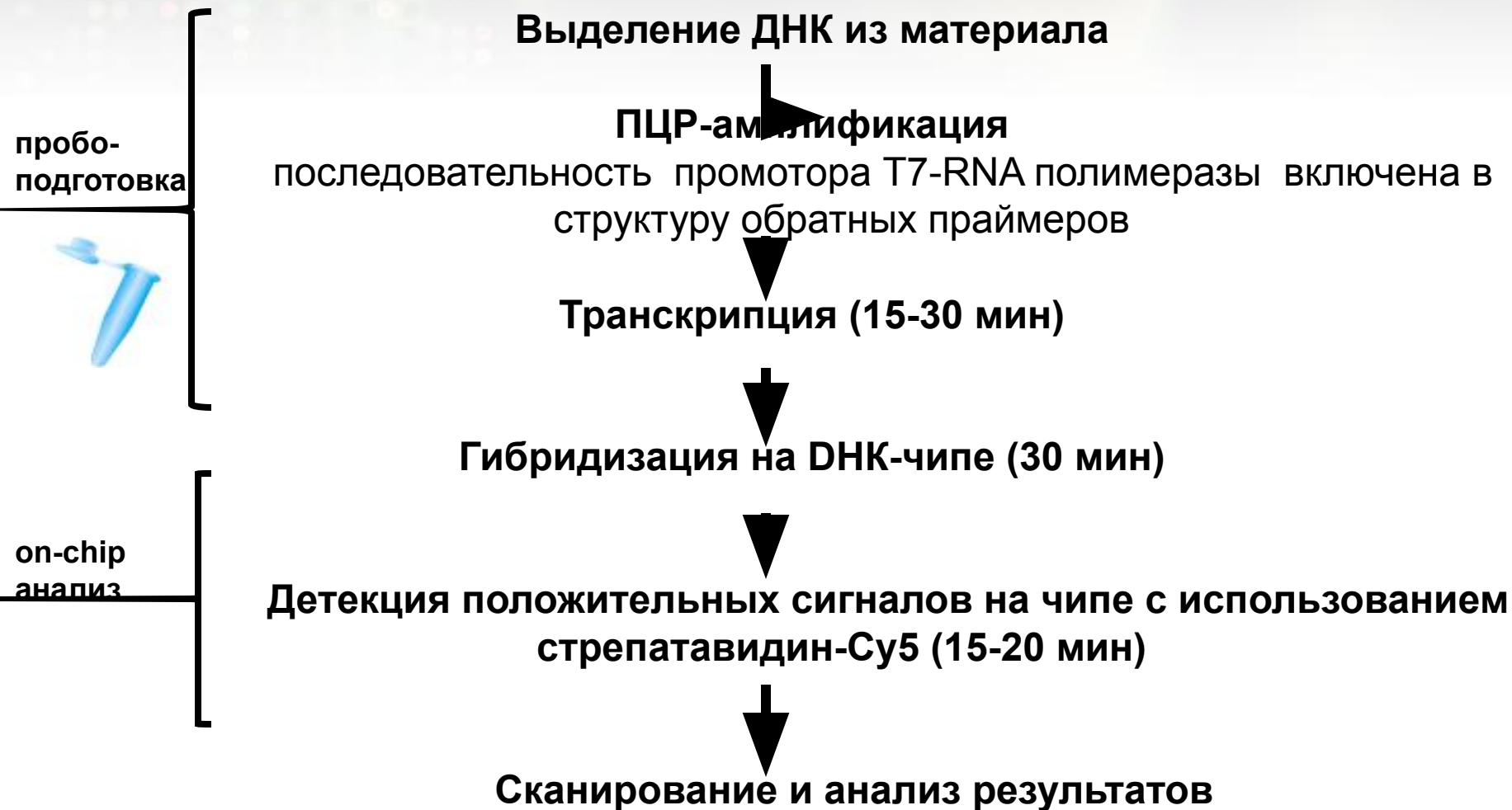
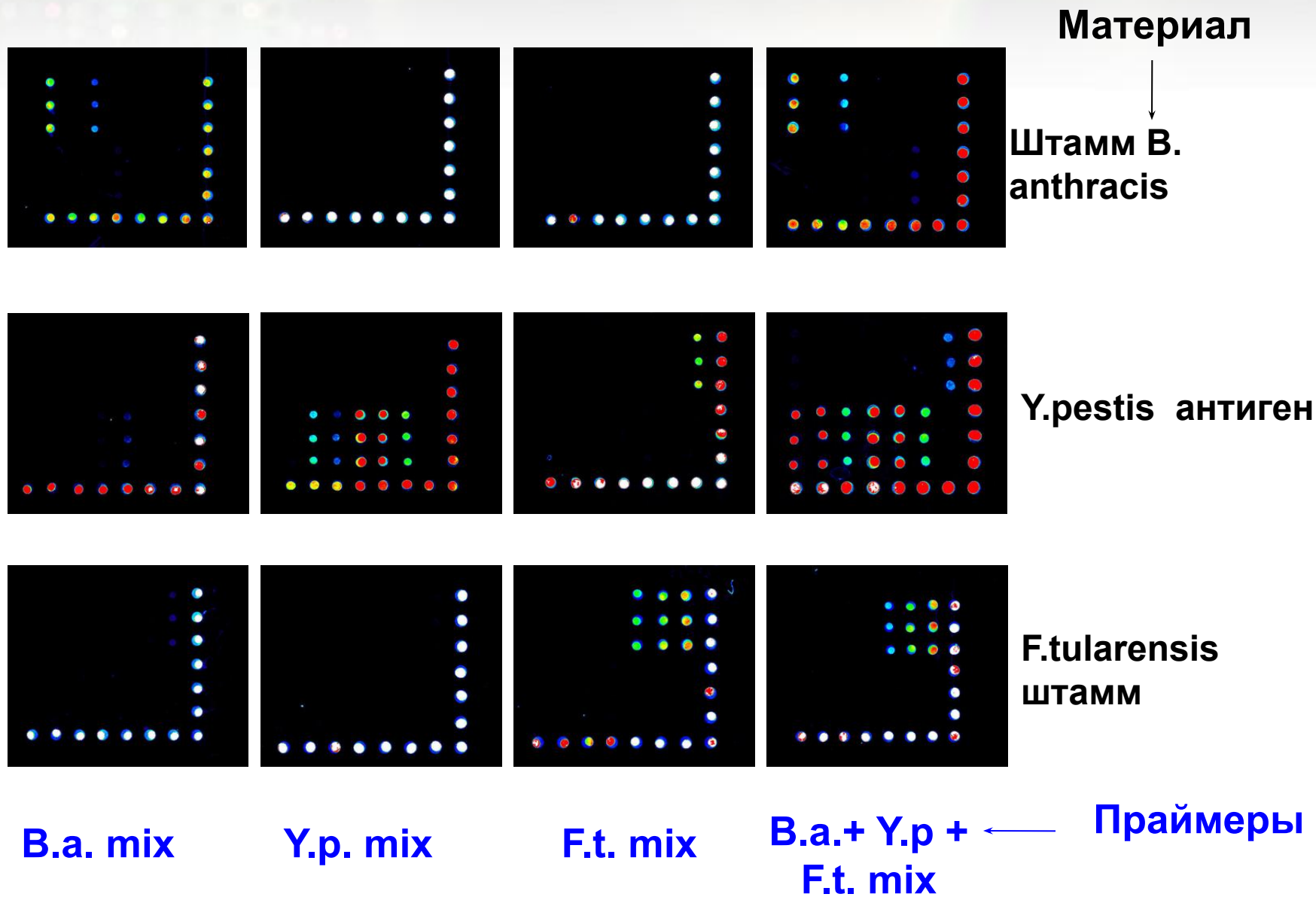


Схема анализа с помощью ДНК-чипа



Примеры флуоресцентных паттернов после гибридизации на ДНК-чипе



Наши планы

- 1. Регистрация тест-систем для серодиагностики TORCH, сифилиса, трансфузионных инфекций, боррелиоза.**
- 2. Разработка программы для обсчета результатов и формирования клинического отчета, удобного для врача-лаборанта.**
- 3. Организация производства биочипов.**
- 4. Взаимодействие с клиническими базами.**
- 5**



СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!