

# **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

-

- невозможно получить результаты по нескольким маркерам заболевания в одном анализе (различные протоколы, различные наборы),
- высокая себестоимость для комплексной диагностики (несколько маркеров)

+

- широко используется в клинической практике,
- доступное оборудование,
- разумная цена для единичного анализа

**ИФА**



VS

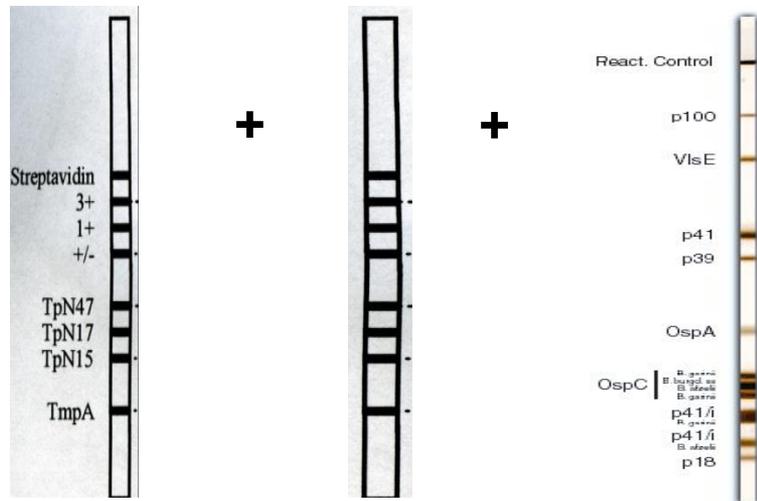


**Иммуночип**

# Иммуноблот

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

## Иммуноблот



VS

## Иммуночип



# Технологии не для каждой лаборатории

## Evidence (RANDOX)

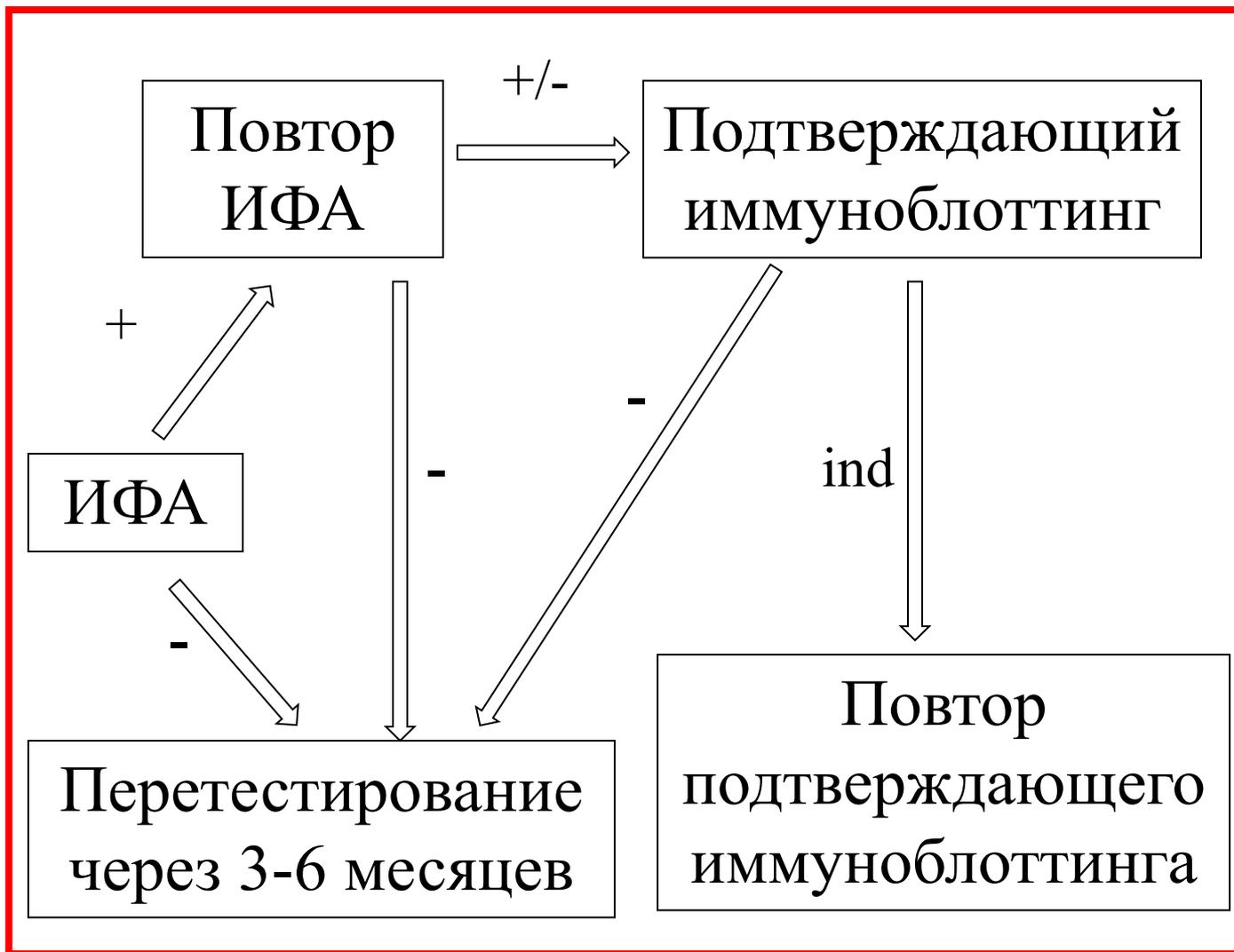


## BioPlex (BIO-RAD)



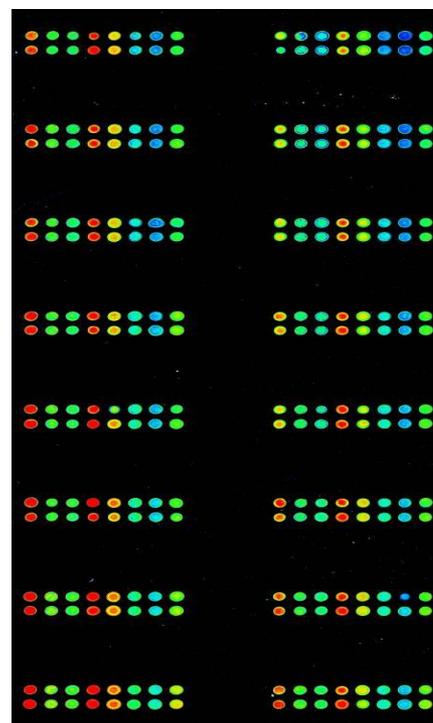
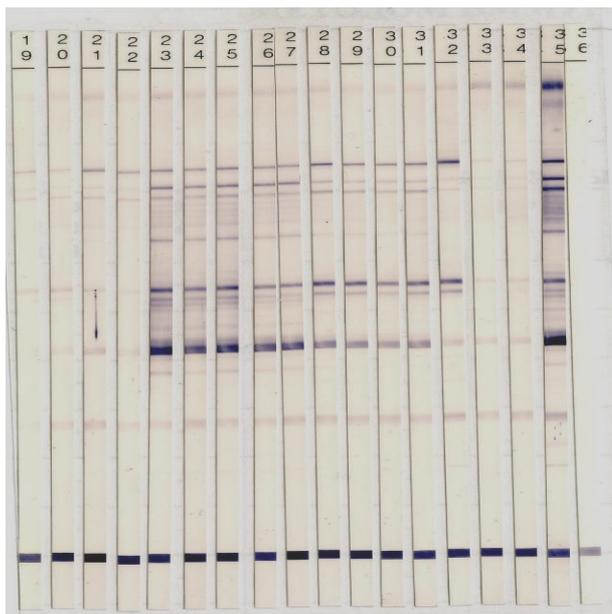
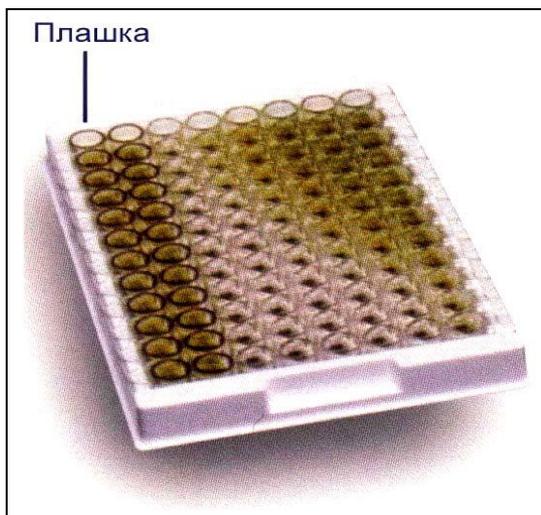
+	-
Автоматическое процессирование	Очень дорогие тест-системы и оборудование
Мультиплексность анализа (до 500 параметров)	Дорогое техническое обслуживание

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



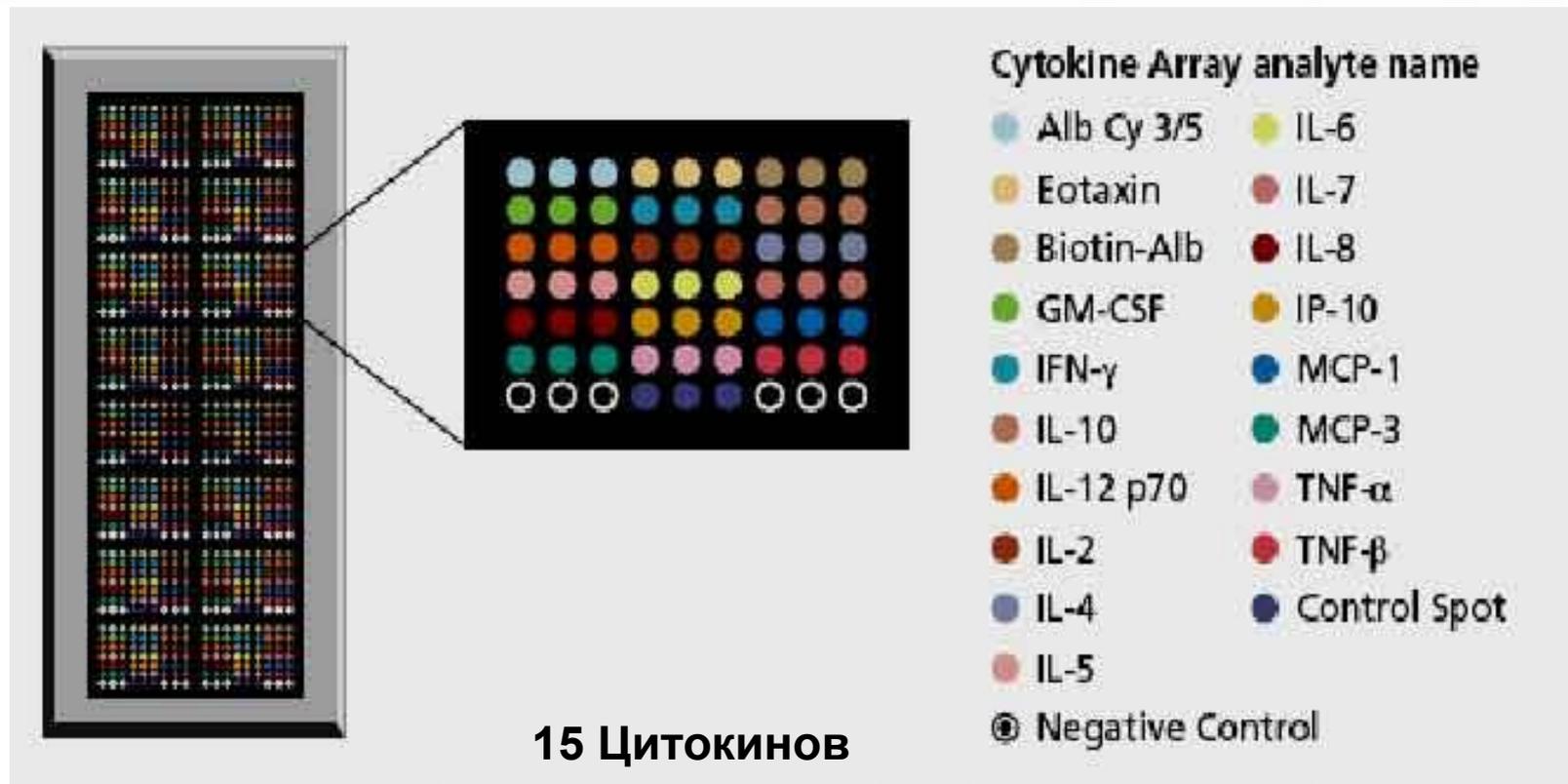
# Иммуночип

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

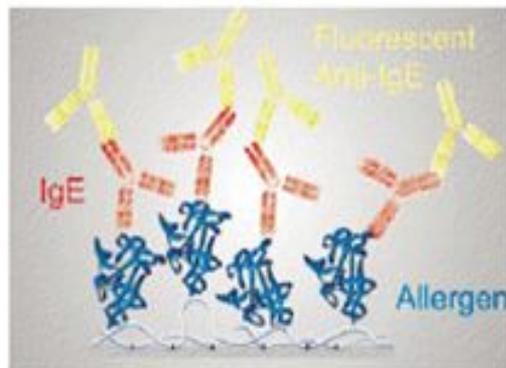
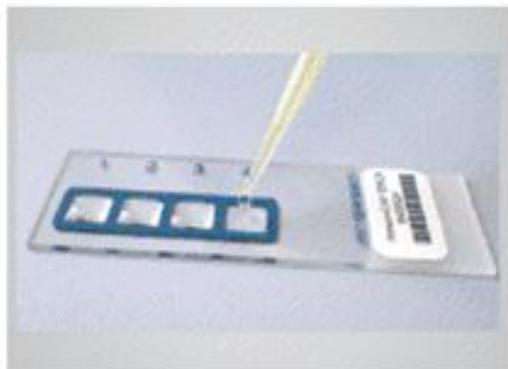


сопоставимый (или >) по чувствительности с ИФА, а по специфичности с иммуноблотом

# Принципиальное отличие биочипов – возможность выявления в одном анализе множества маркеров

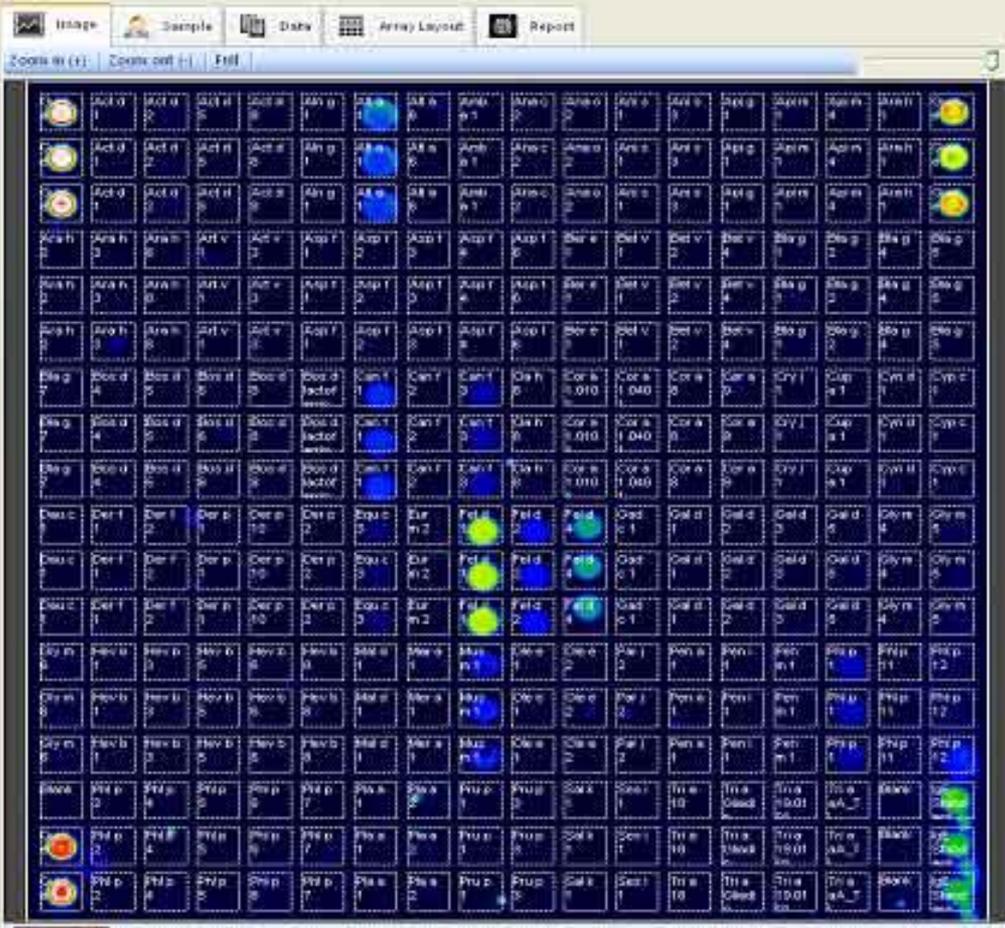


# Аллергочип ImmunoCAP ISAC IgE



***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

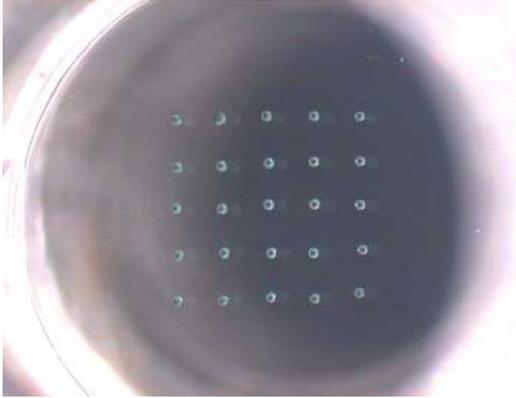


ID	Barcode	Pos	Sample Code
AD	OB11924	1	OB11924_1
OB	OB11924	2	OB11924_2
OB	OB11924	3	OB11924_3
OB	OB11924	4	OB11924_4
Failed	OB12024	1	OB12024_1
Failed	OB12024	2	OB12024_2
Failed	OB12024	3	OB12024_3
Failed	OB12024	4	OB12024_4
Failed	OB12124	1	OB12124_1
Failed	OB12124	2	OB12124_2
Failed	OB12124	3	OB12124_3
Failed	OB12124	4	OB12124_4
Failed	OB12224	1	OB12224_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
<b>AD</b>	<b>OB11924</b>	<b>1</b>	<b>OB11924_1</b>
OB	OB12724	4	OB12724_4

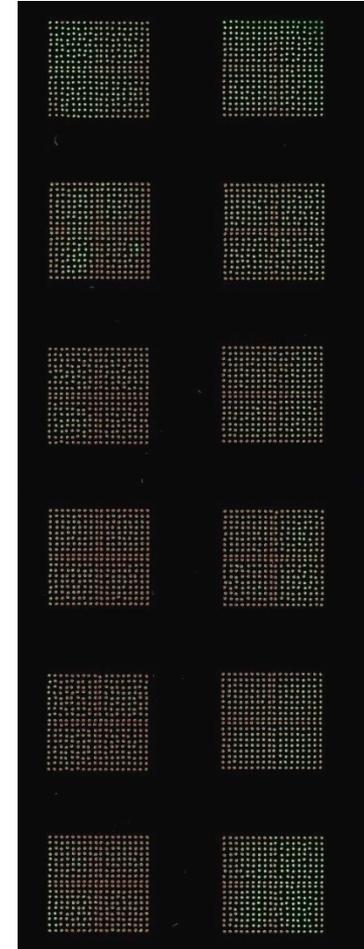
Method:  Specificity:

Finish

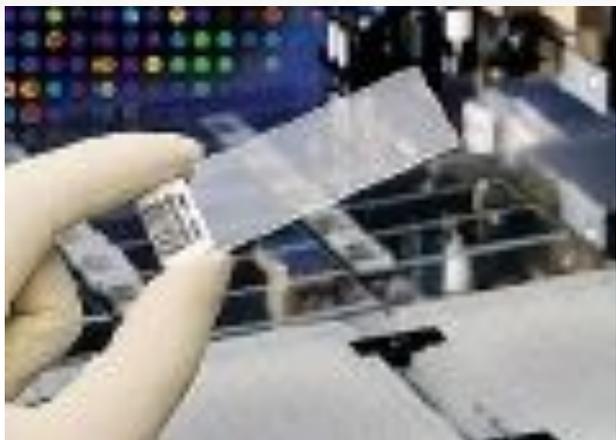
# Новая технология бесконтактной микропечати с помощью современных наноплоттеров



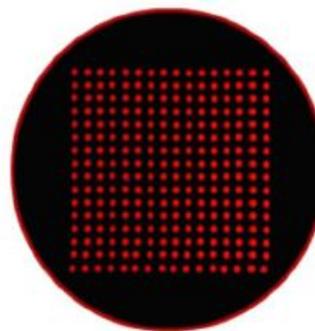
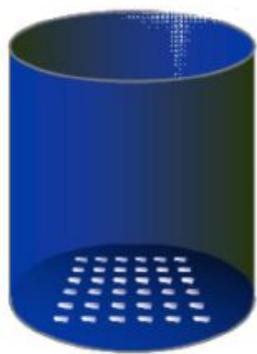
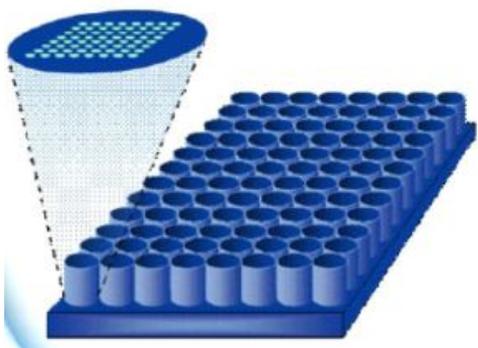
*Позволяют печатать  
на слайды или дно лунок  
планшетов*



1 чип (слайд) = 1 образец



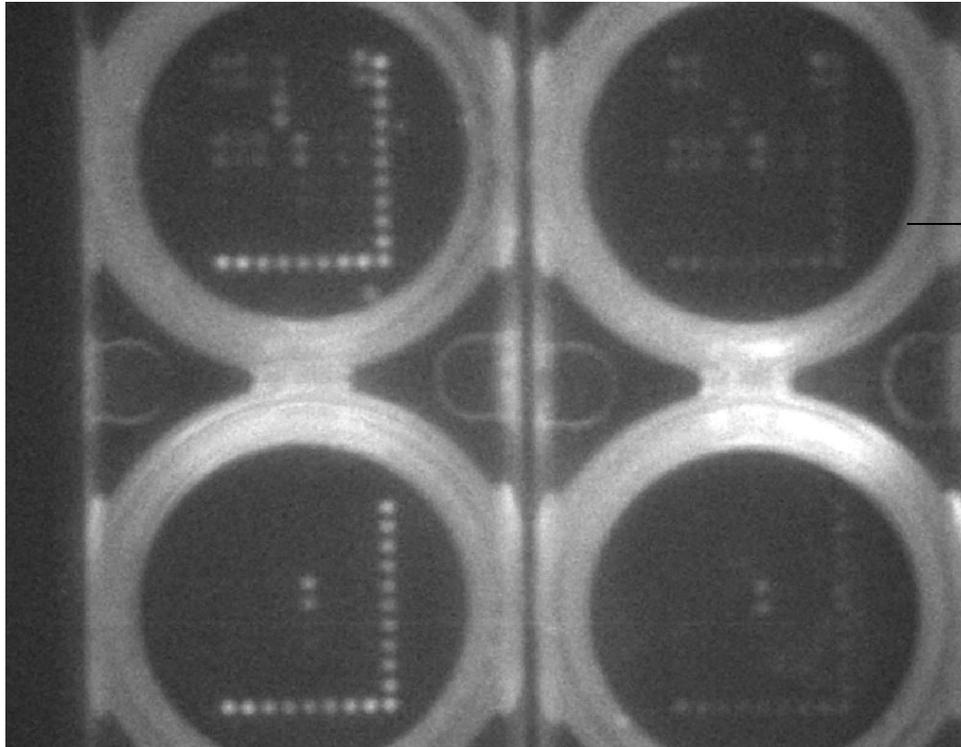
1 слайд = 16 образцов,  $16 \times 4 = 64$  образца



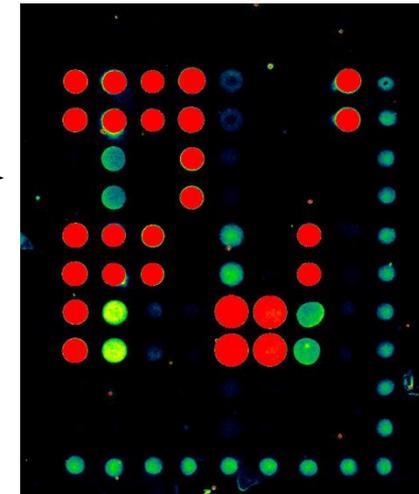
1 планшет = 96 образцов



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

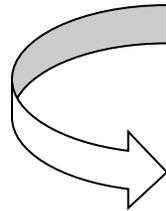
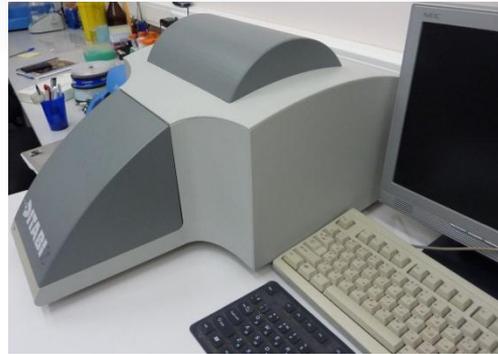


Эррей – лунка планшета

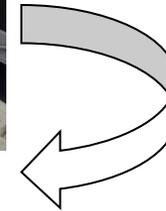
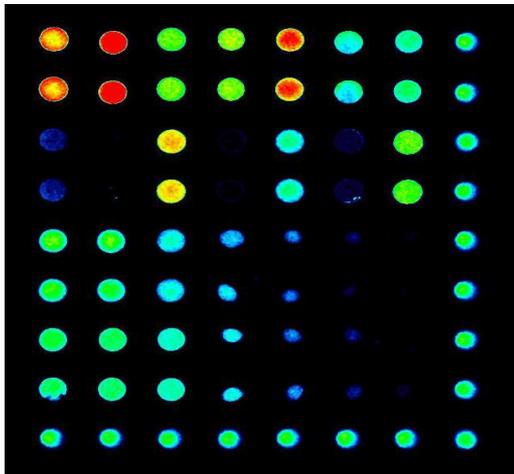


Флуоресцентный профиль  
эррея на альдегидном слайде

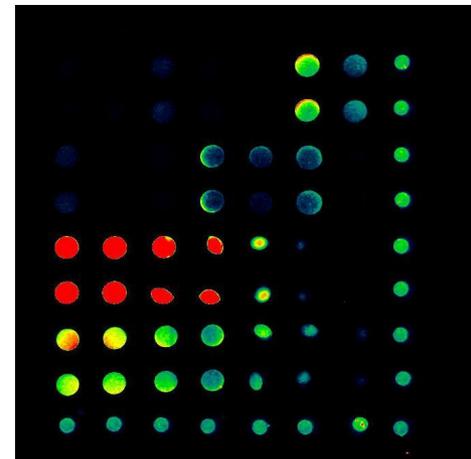
# Детекция антител разных классов в одной постановке в одном эррее



**КАНАЛ Cy5**  
(антитела IgG)

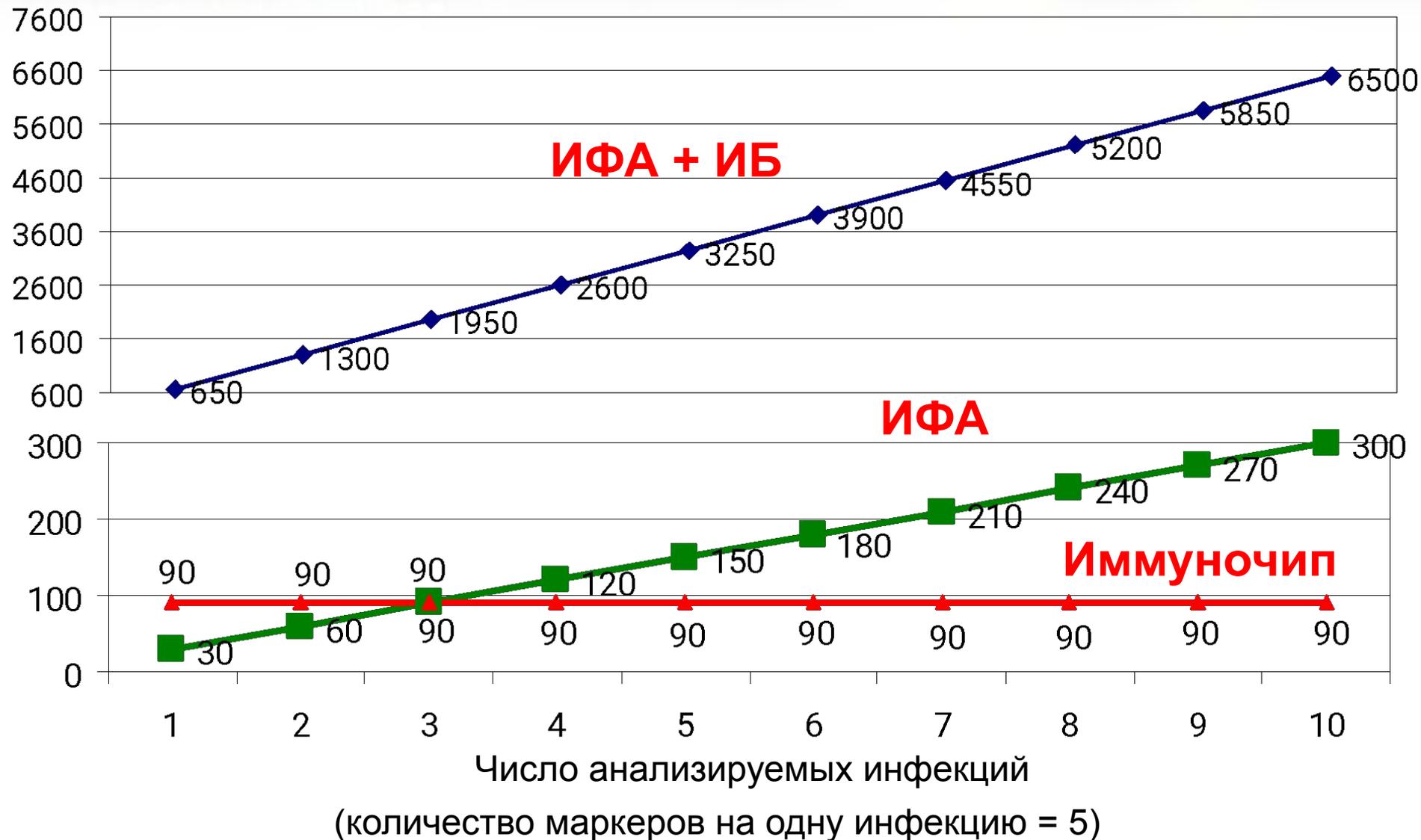


**КАНАЛ Cy3**  
(антитела IgM)

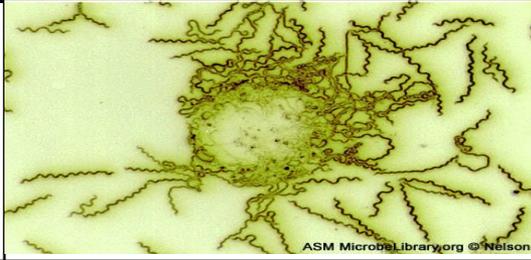


# Себестоимость анализа при использовании разных серологических методов

руб



# Принципы размещения антигенов и антител на одном иммуночипе

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

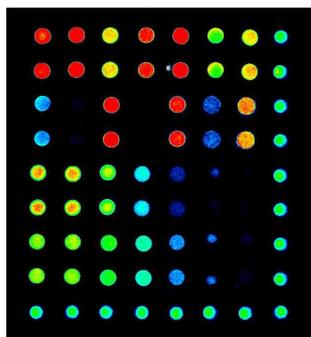




**ТЕСТ-СИСТЕМЫ  
В ФОРМАТЕ ИММУНОЧИПОВ,  
РАЗРАБАТЫВАЕМЫЕ В ЦНИИЭ**

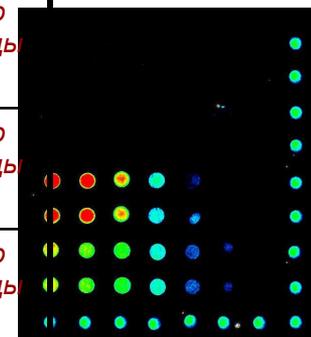
# Дизайн эррея иммуночипа для серодиагностики Лайм-боррелиоза

+



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

-



# Чувствительность и специфичность иммуночипа для серодиагностики ИКБ

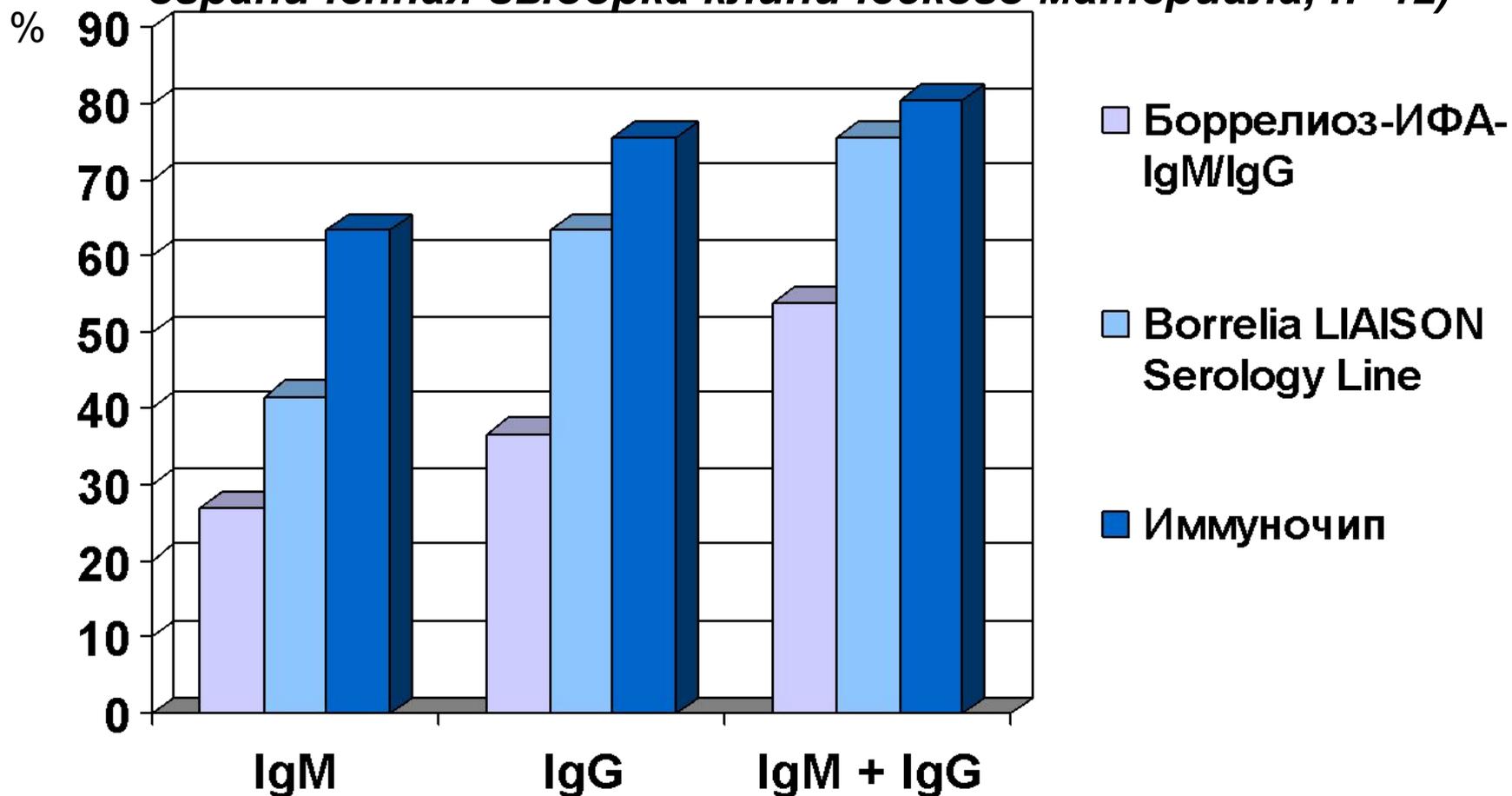
*(клинический материал предоставлен и охарактеризован клиническими базами: МОНИКИ, НИИР РАМН, Центрами санэпиднадзора - г. Ижевск, г. Киров, г.Ярославль, г. С.-Петербург)*

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

# 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*



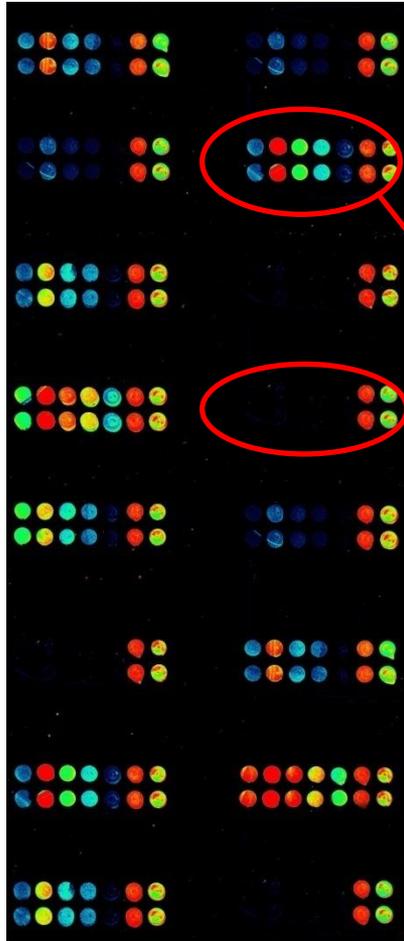
*B.*  
*burgdorferi* s.l

*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***



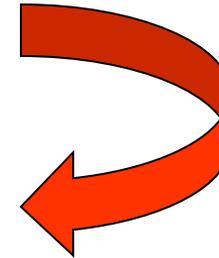
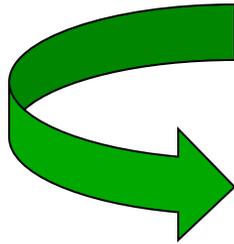
# Флуоресцентная детекция спектра антител разных классов: IgG и IgM

*Канал Cy3*

*Канал Cy5*

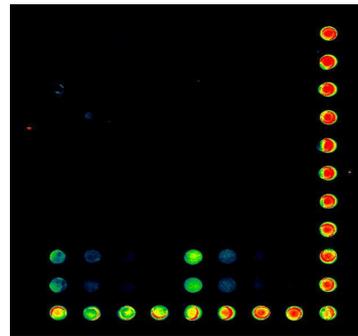
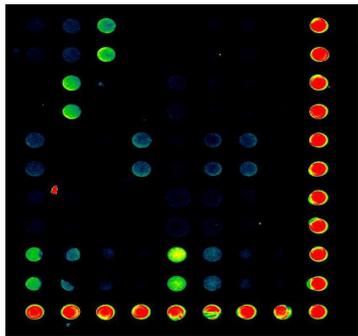
конъюгат анти-IgM человека-Cy3

+ конъюгат анти-IgM человека-Cy3



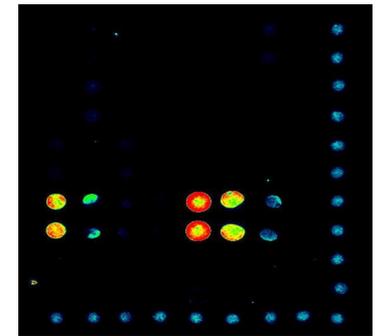
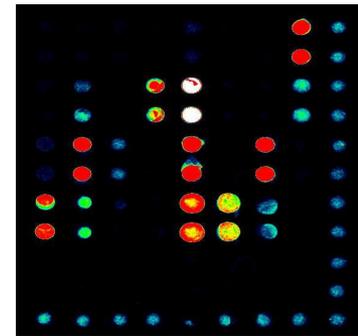
+

-



+

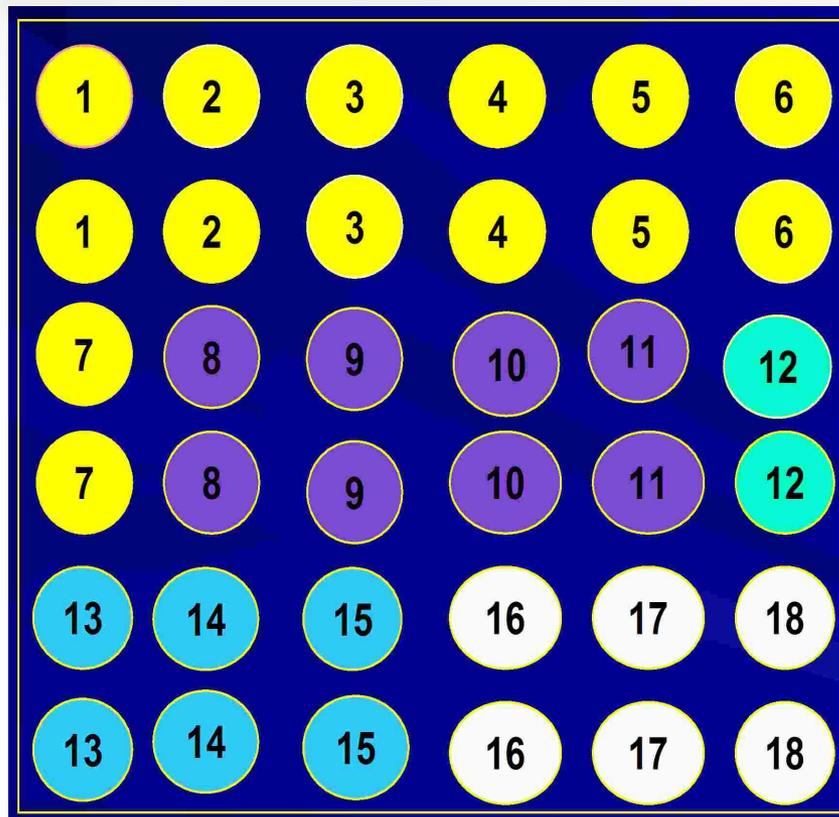
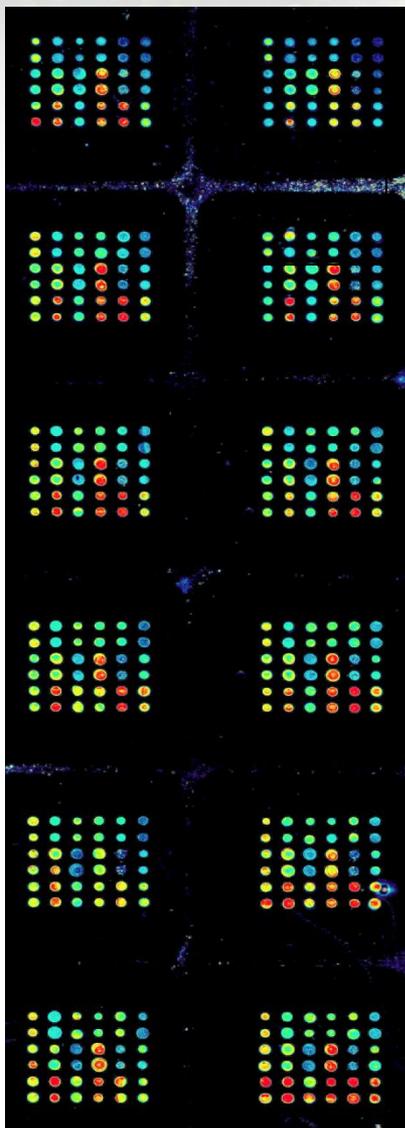
-



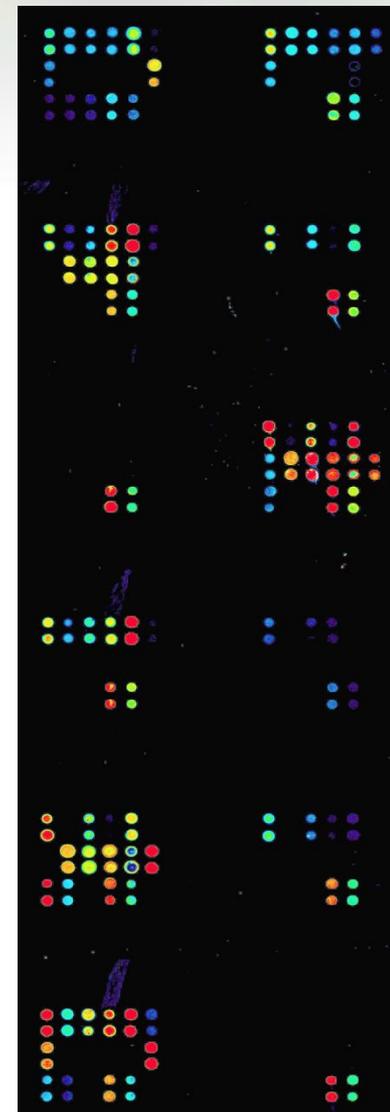
**Совпадение результатов, полученных в иммуночипе,  
с данными ИФА при тестировании сывороток  
(всего- 700 шт)**

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

# 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	<b>385</b>	<b>41</b>	<b>35</b>	<b>380</b> (5 – н/о)
- ОСО ВИЧ-1(+)	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
- ОСО ВИЧ-2 (+)	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
- ОСО ВГС (№№1-16 +)	<b>16</b>	<b>0</b>	<b>16</b>	<b>0</b>
- от больных ВГС	<b>400</b>	<b>56</b>	<b>392</b> (8 – н/о)	<b>22</b>
- от ВИЧ-инфицированных	<b>465</b>	<b>461</b> (4 – н/о)	<b>188</b>	<b>45</b>
Чувствительность, %		<b>99.1</b>	<b>98.0</b>	<b>98.7</b>

## 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	<b>400</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
- ОСО ВИЧ ( - )	<b>20</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
- ОСО ВГС (№№ 17-24 - )	<b>8</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
- от лиц с аутоиммунными заболеваниями	<b>50</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
- от инфекционных больных другой этиологии	<b>200</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
<b>Специфичность, %</b>		<b>99,4</b>	<b>99.3</b>	<b>99.1</b>

# 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

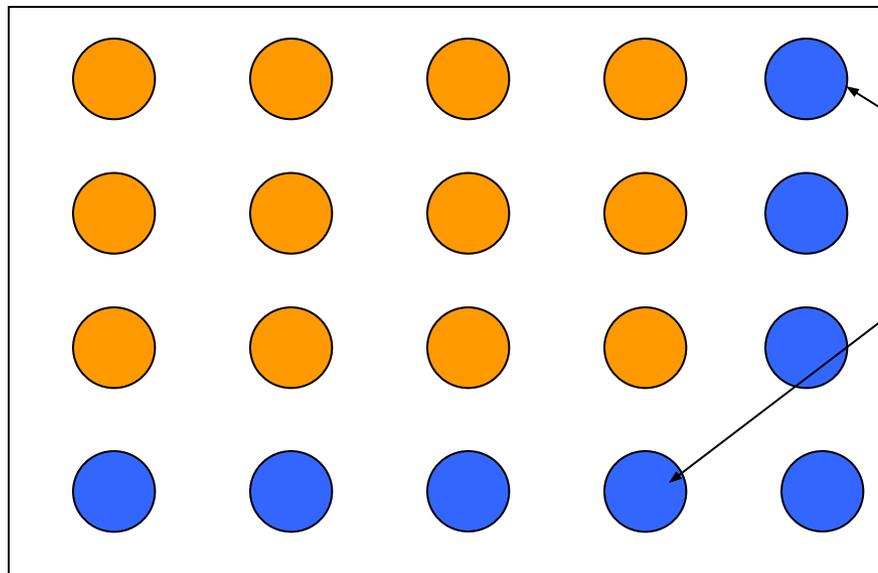
К -

SA26

IgG F1

К -

Один эррей

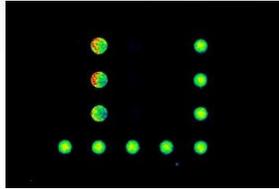


BSA-Cy5

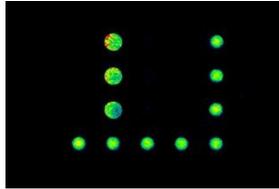
# Примеры флуоресцентных паттернов. Аналитическая чувствительность

*B. anthracis*

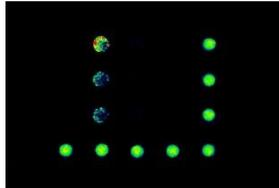
$10^7$  cells/ml



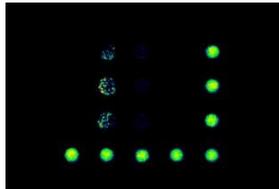
$10^6$  cells/ml



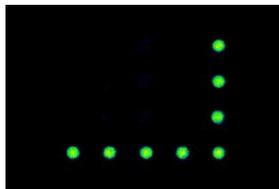
$10^5$  cells/ml



$10^4$  cells/ml

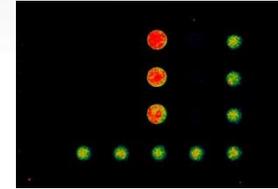


$10^3$  cells/ml

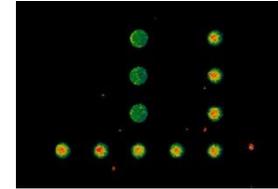


*Y. pestis*

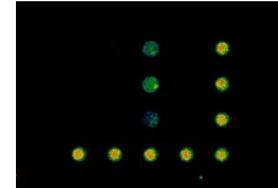
$10^7$  cells/ml



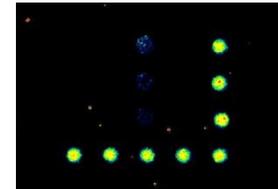
$10^6$  cells/ml



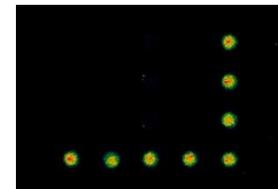
$10^5$  cells/ml



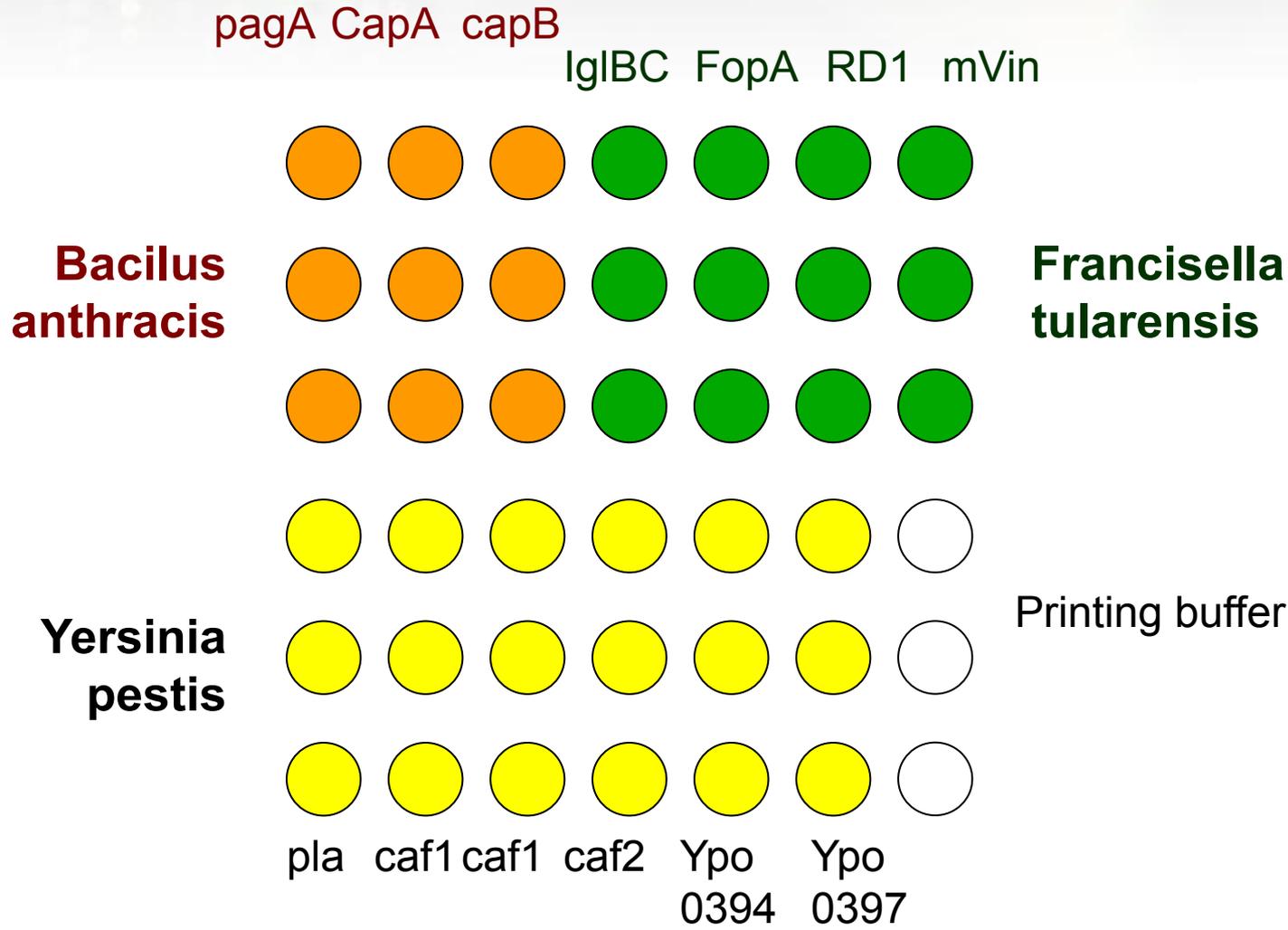
$10^4$  cells/ml



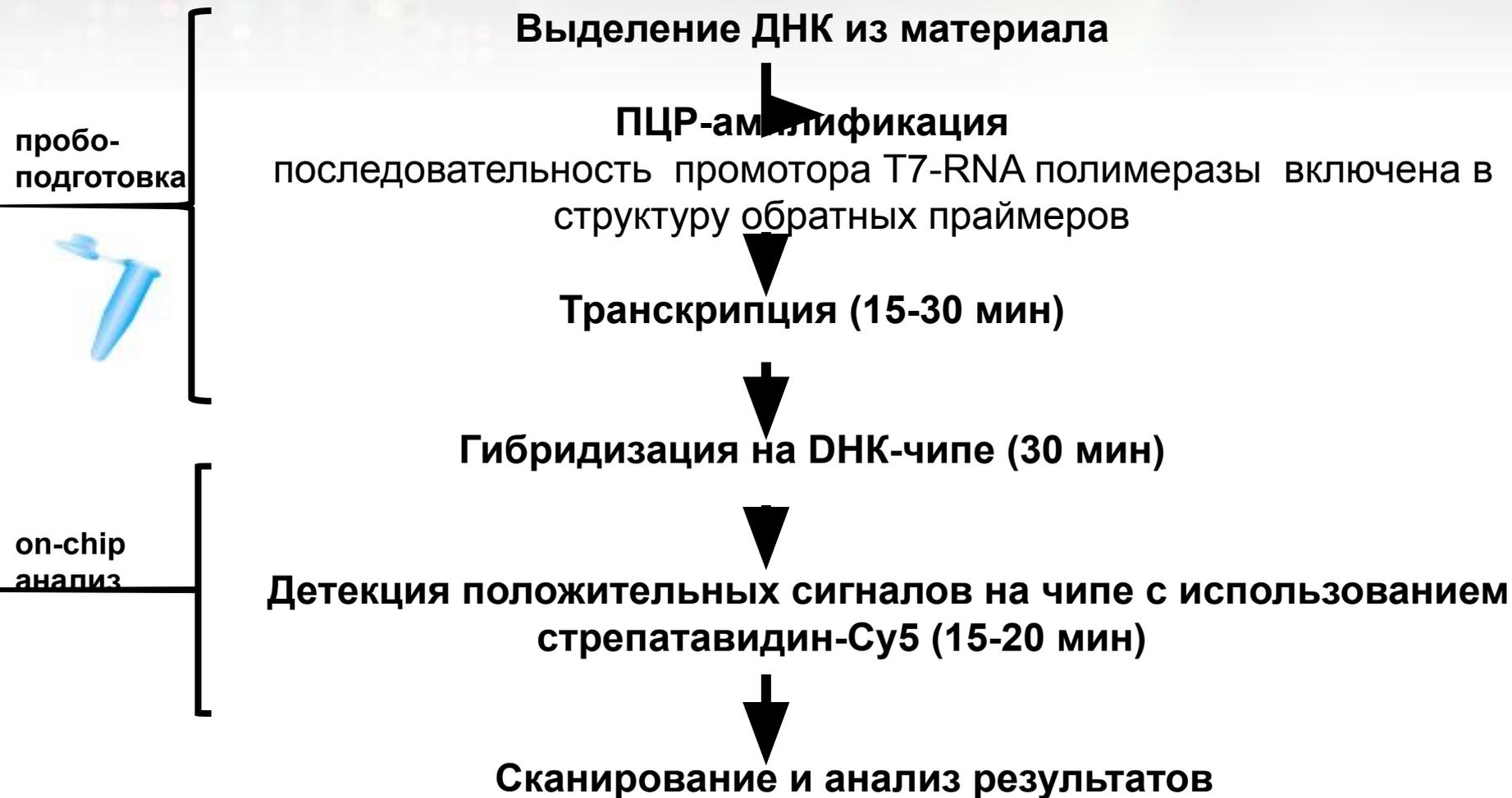
$10^3$  cells/ml



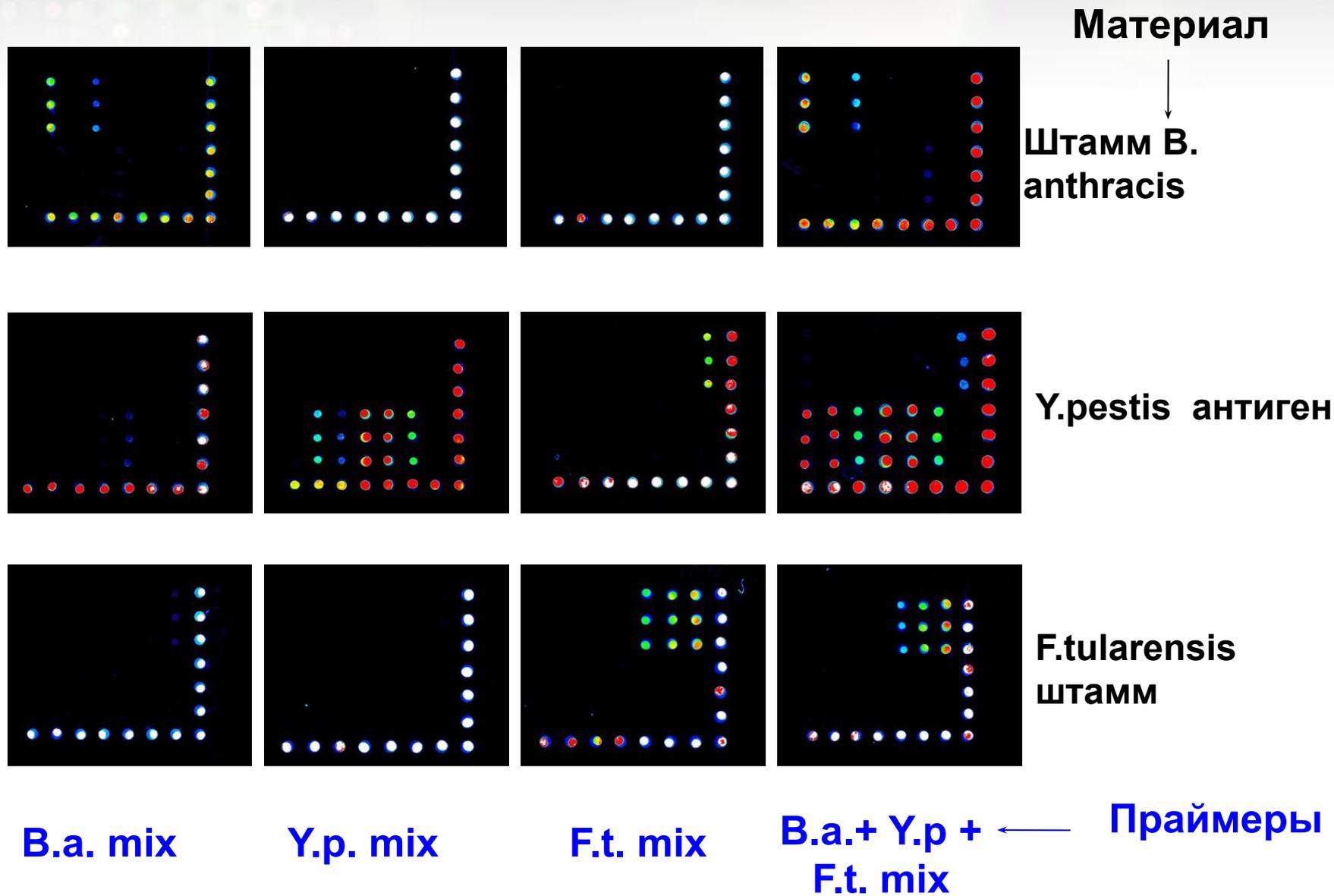
# ДНК-чип для детекции *B.anthraxis*, *Y.pestis*, *F.tularensis*



# 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!**