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

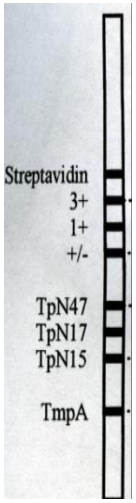
VS

Иммуночип

Иммуноблот

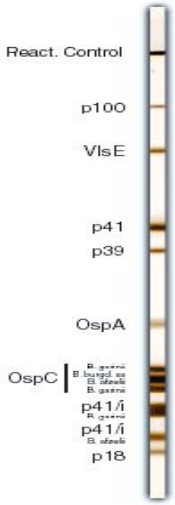
-	+
- невозможно получить результаты по нескольким инфекциям за один анализ (различные наборы), - очень высокая цена анализа, - субъективная интерпретация результатов	- широко распространен в клинической практике, - не нуждается в специализированном оборудовании

Иммуноблот



+

+



VS

Иммуночип

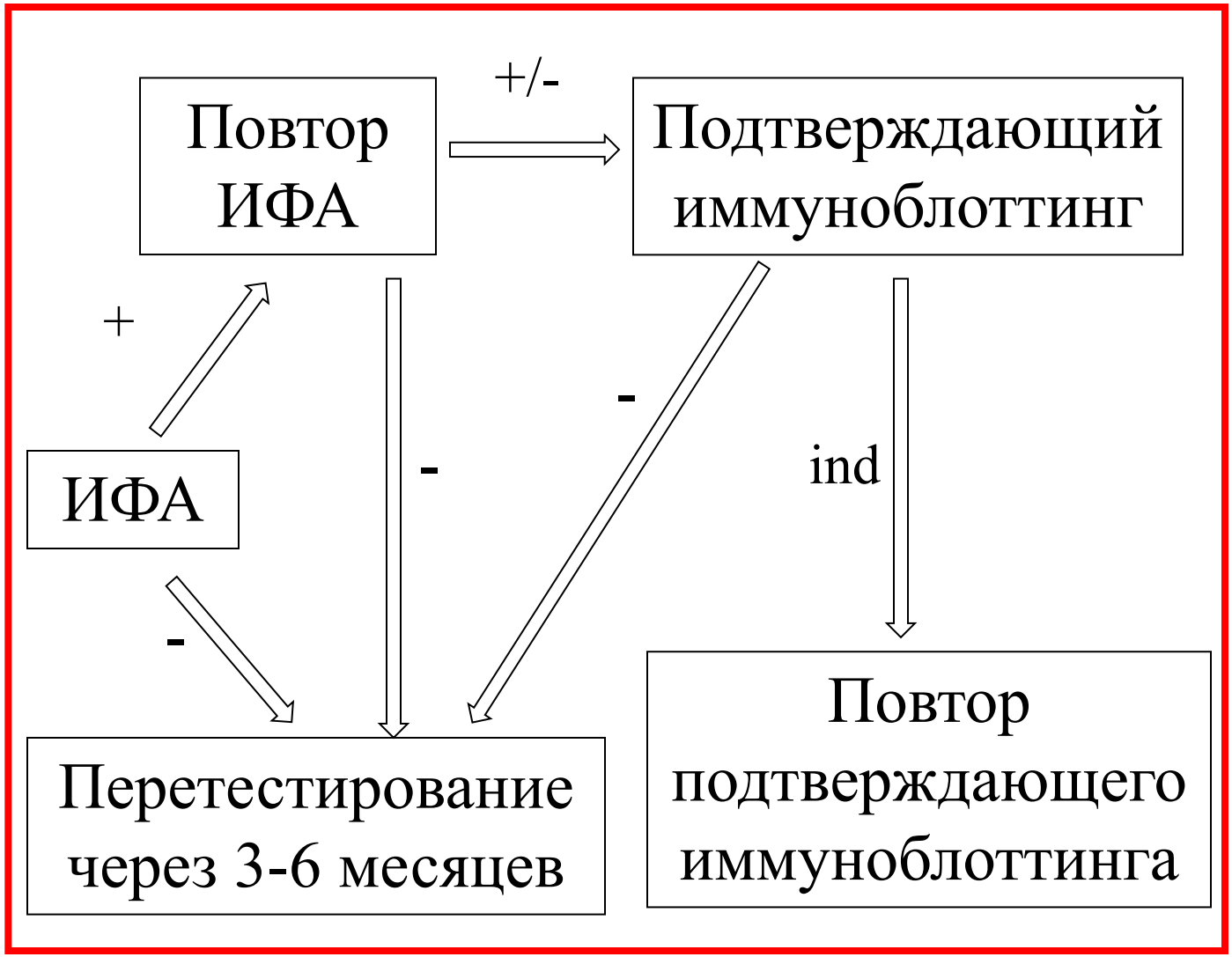
Технологии не для каждой лаборатории

Evidence (RANDOX)

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

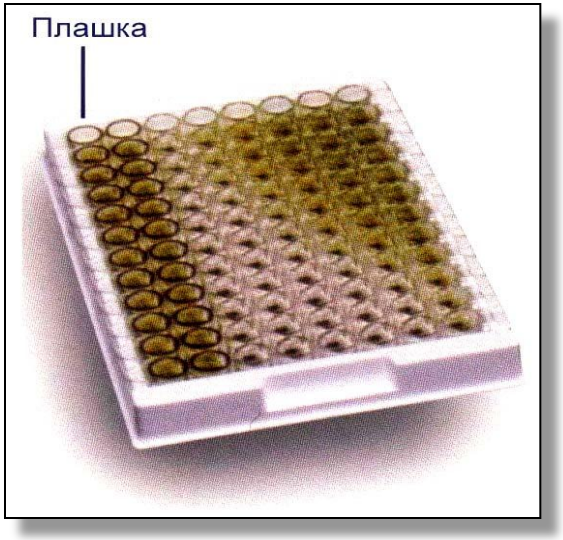
BioPlex (BIO-RAD)

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

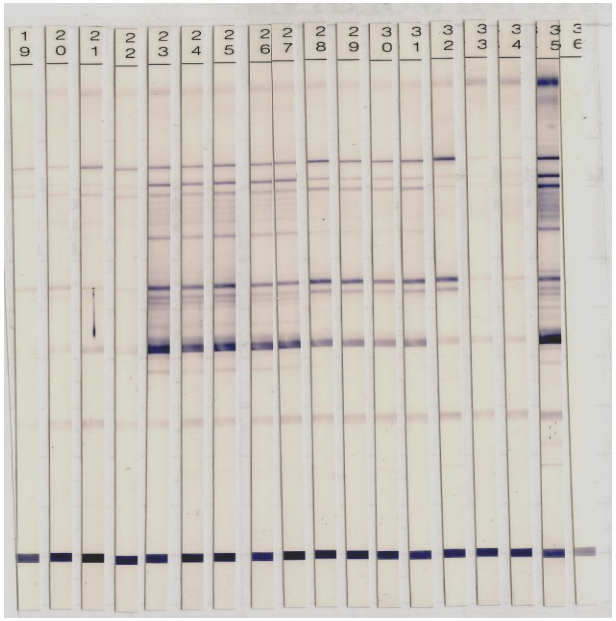


Иммуночип

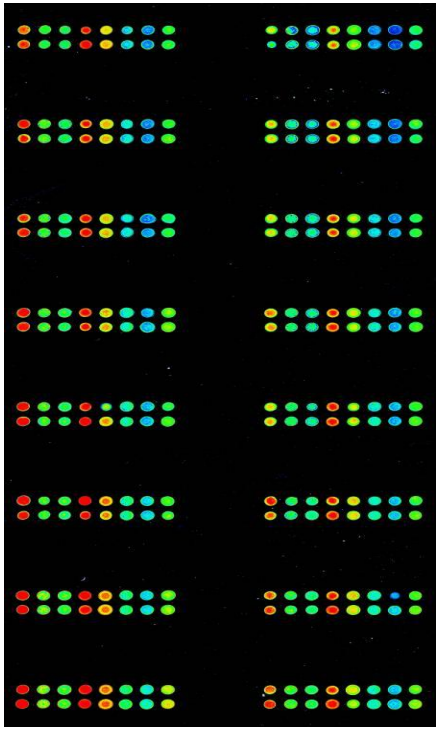
– одноэтапный тест для выявления большого числа значимых биологических маркеров заболеваний,
- высокая информативность,
- возможность сочетания скрининга и подтверждения в одном формате



+

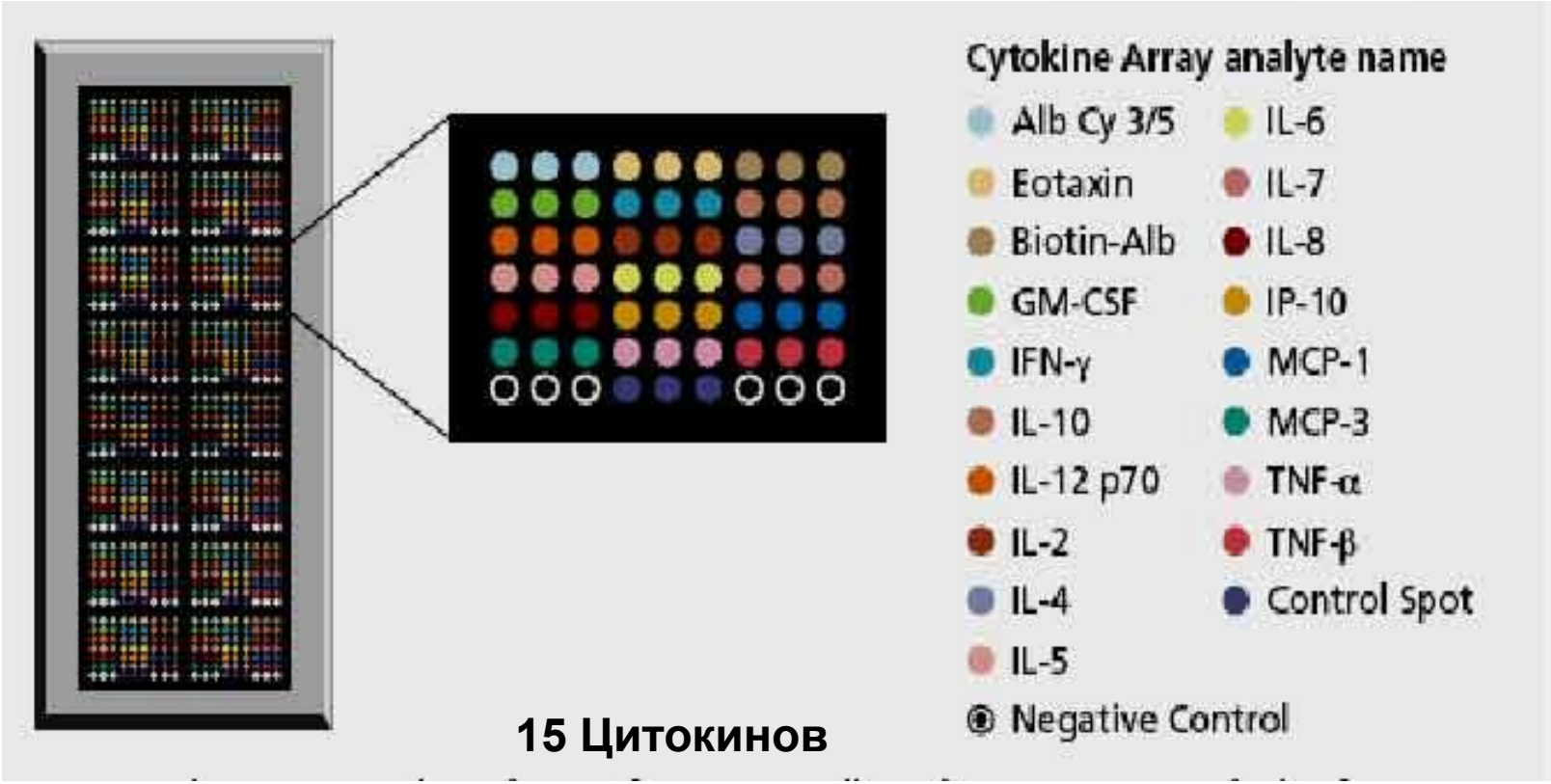


=



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

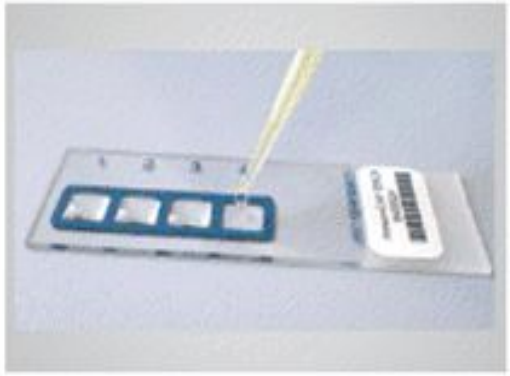
Принципиальное отличие биочипов – возможность выявления в одном анализе множества маркеров

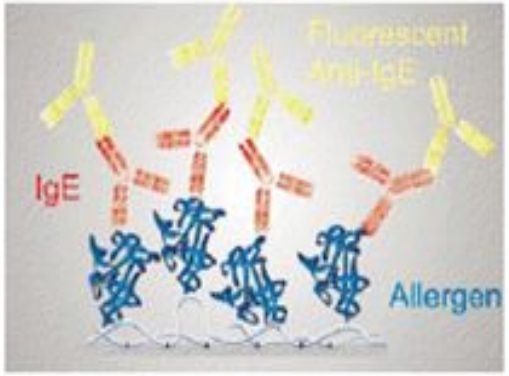


15 Цитокинов

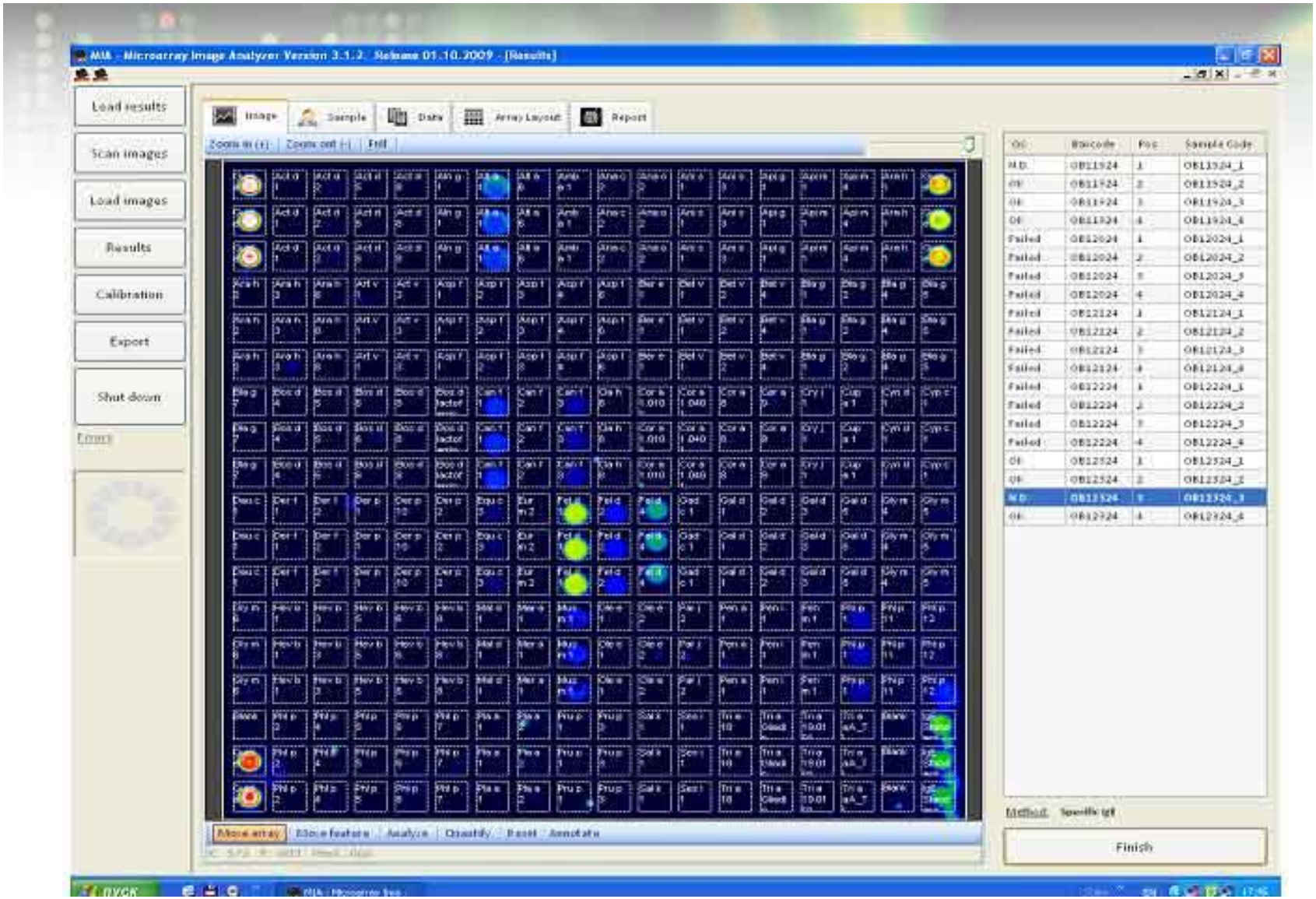
Clontech
a TAKARA BIO company

Аллергочип ImmunoCAP ISAC IgE

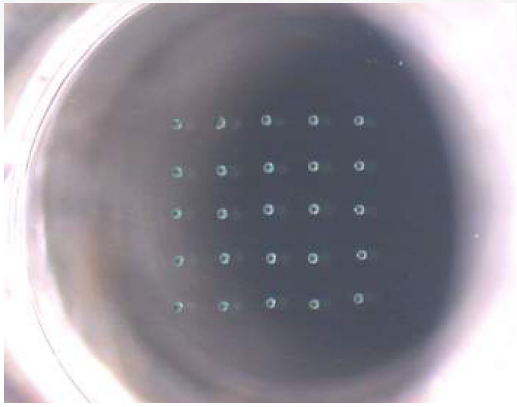




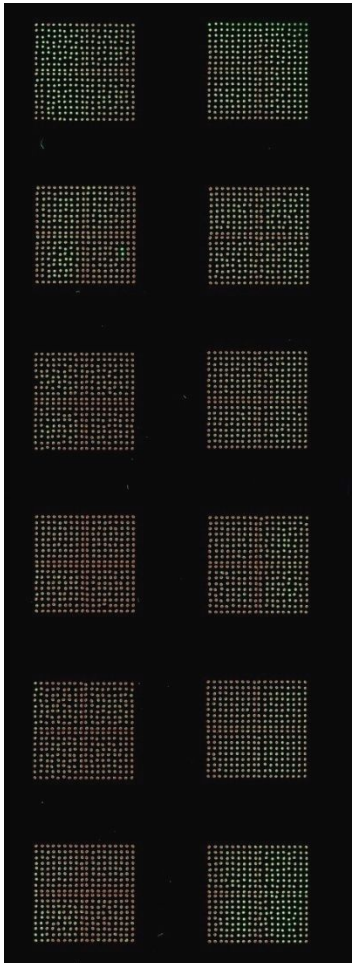
Общее время проведения реакции на чипе – около 5 часов
Минимальное количество образца – 20 мкл на 103 аллергена
Простота постановки


MIA - Microarray Image Analyzer Version 3.1.2. Release 01.10.2009 - [Results]
Load results
Scan images
Load images
Results
Calibration
Export
Shut down
Errors
Image
Sample
Data
Array Layout
Report
Zoom in (+)
Zoom out (-)
Fill
Show array
Show feature
Analyze
Classify
Reset
Annotate
Finish

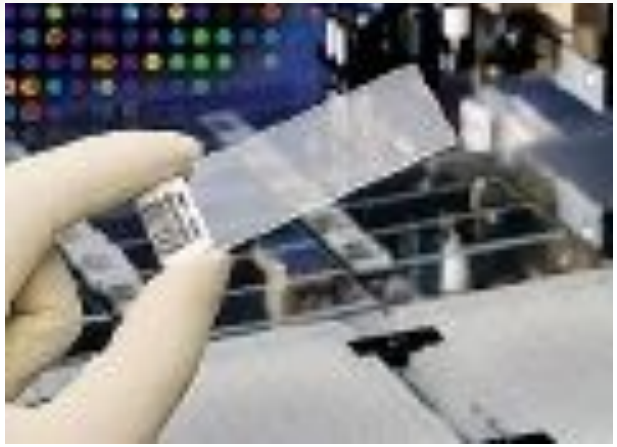
Новая технология бесконтактной микропечати с помощью современных наноплоттеров



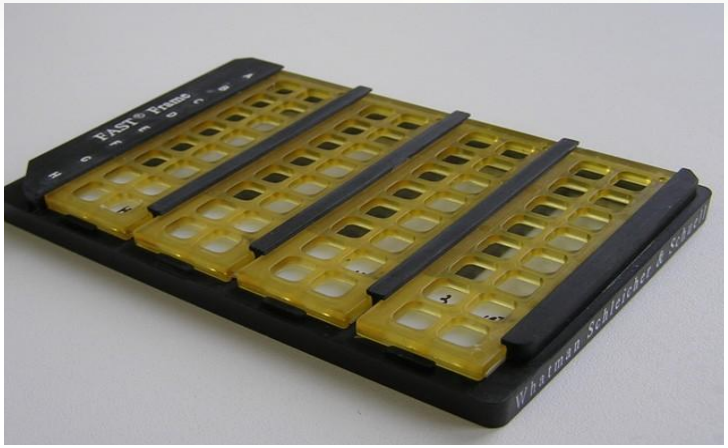
Позволяют печатать на слайды или дно лунок планшетов

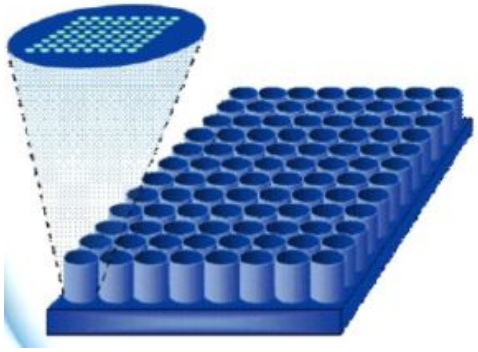


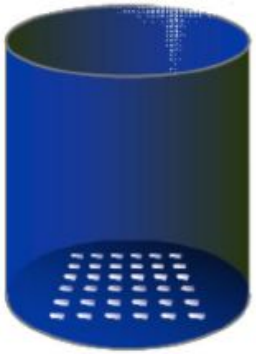
1 чип (слайд) = 1 образец



1 слайд = 16 образцов, 16 x 4 = 64 образца

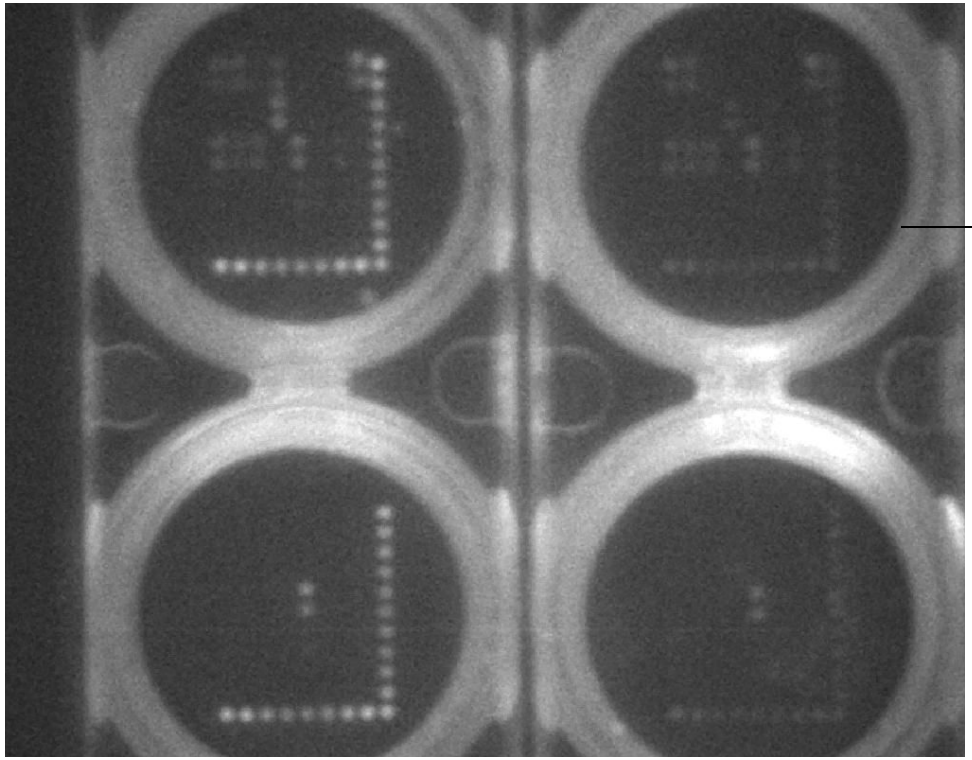


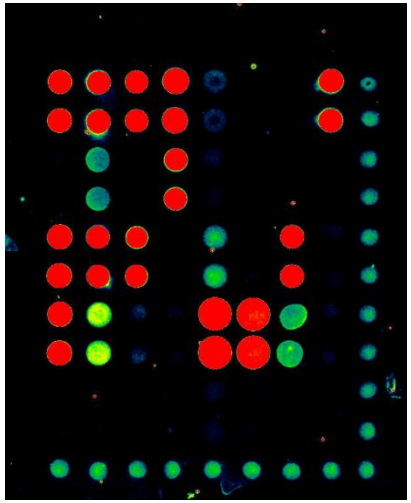




1 планшет = 96 образцов

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

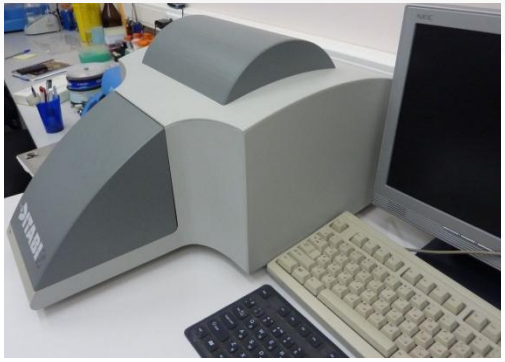




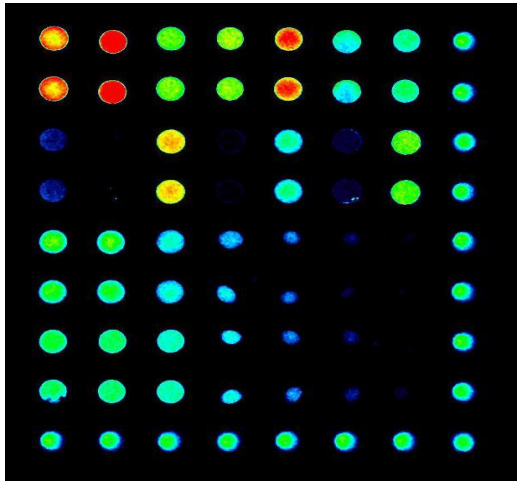
Флуоресцентный профиль эррея на альдегидном слайде

Эррей – лунка планшета

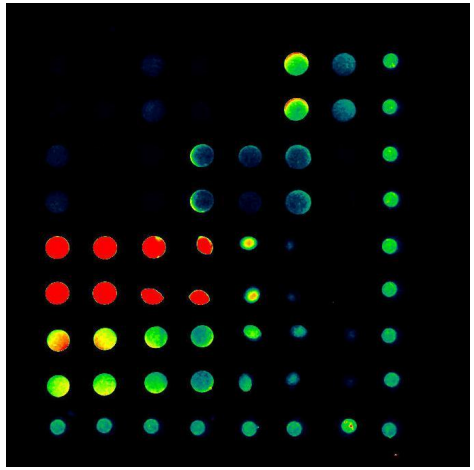
Детекция антител разных классов в одной постановке в одном эррее



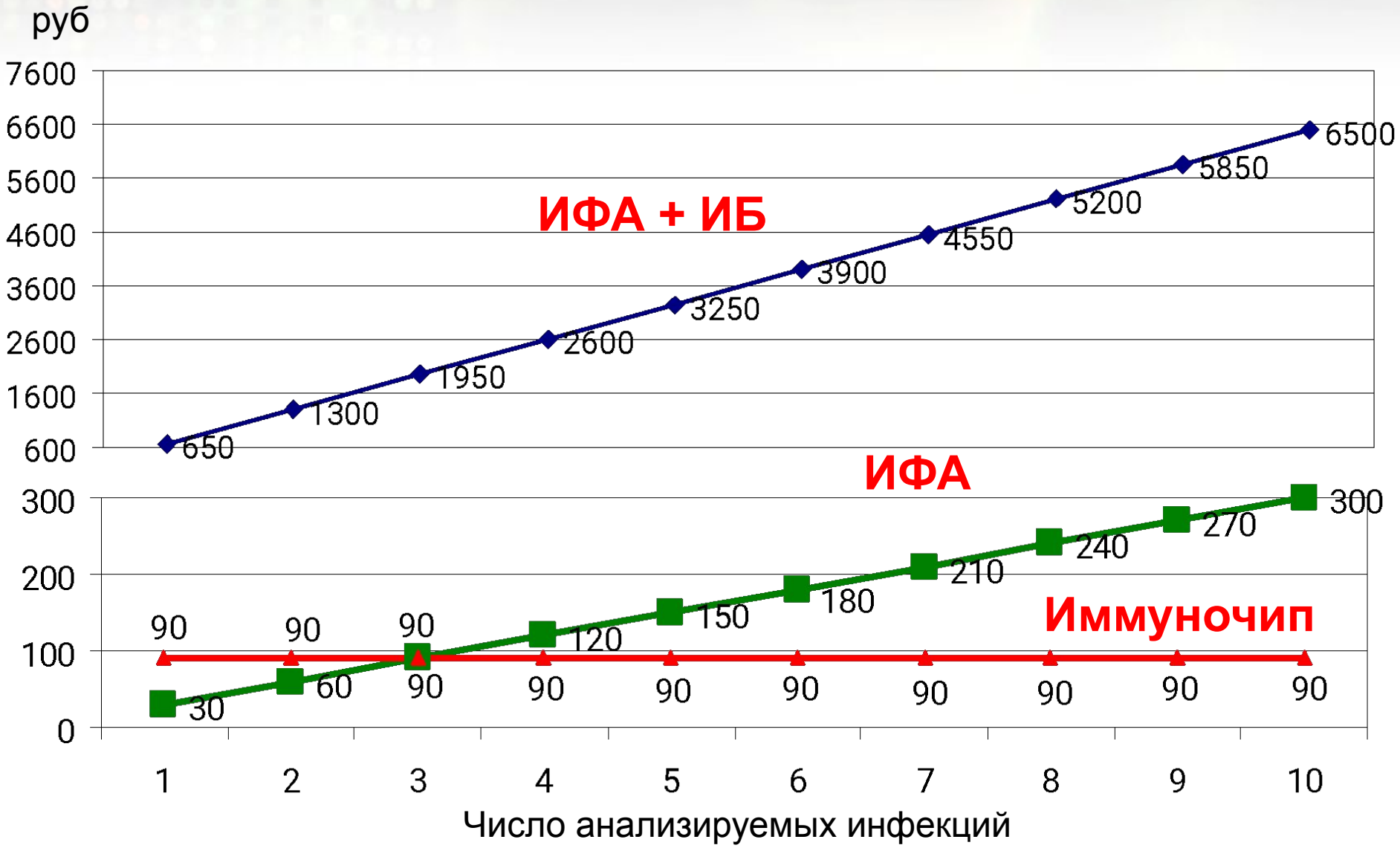
КАНАЛ Cy5
(антитела IgG)



КАНАЛ Cy3
(антитела IgM)



Себестоимость анализа при использовании разных серологических методов



Число анализируемых инфекций

(количество маркеров на одну инфекцию = 5)

Принципы размещения антигенов и антител на одном иммуночипе

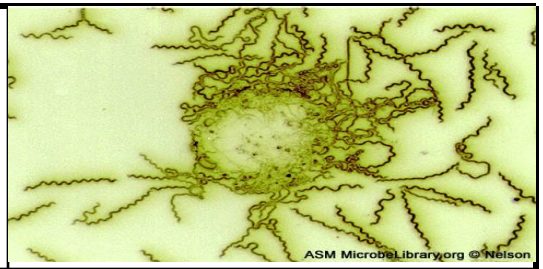
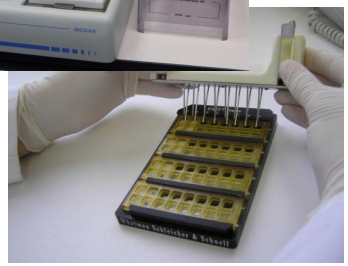
Микроорганизмы, имеющие перекрестно-реагирующие антигены	Инфекции, вызываемые патогенными спирохетами	
Микроорганизмы, имеющие одинаковые пути передачи	Трансфузионные инфекции	
Микроорганизмы, вызывающие сходную патологию	АФС, ToRCH-инфекции	
Микроорганизмы, эндемичные для региона, в котором планируется использовать иммуночип	Арбовирусные инфекции	

Схема проведения анализа с помощью иммуночипа

Разведение сывороток

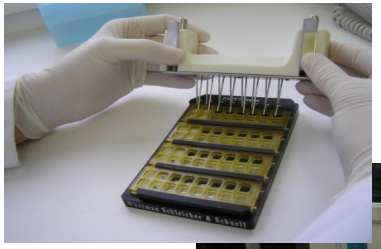
Инкубация с образцом, 37^{0}С

Отмывка

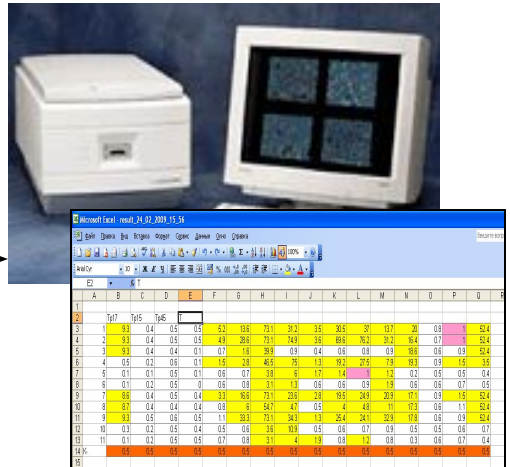


Инкубация с коньюгатом, 37^{0}С

Отмывка



Детекция



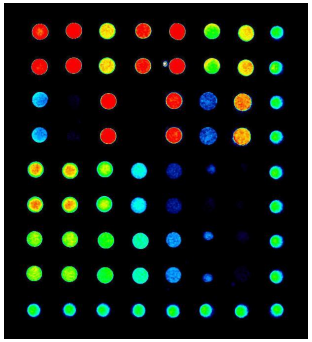
ТЕСТ-СИСТЕМЫ

В ФОРМАТЕ ИММУНОЧИПОВ,

РАЗРАБАТЫВАЕМЫЕ В ЦНИИЭ

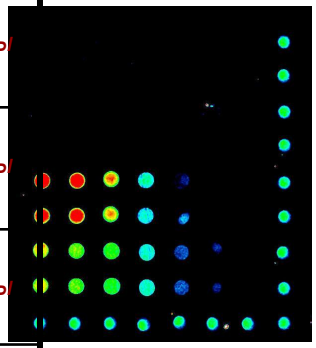
Дизайн эррея иммуночипа для серодиагностики Лайм-боррелиоза

+



p100 B.gar.	p100 B.afz	VlsE B.gar.	VlsE B.afz	p58 B.afz.	p41 B.gar	p41 B.afz	*маркер границы эррея*
p100 B.gar.	p100 B.afz	VlsE B.gar.	VlsE 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*

-



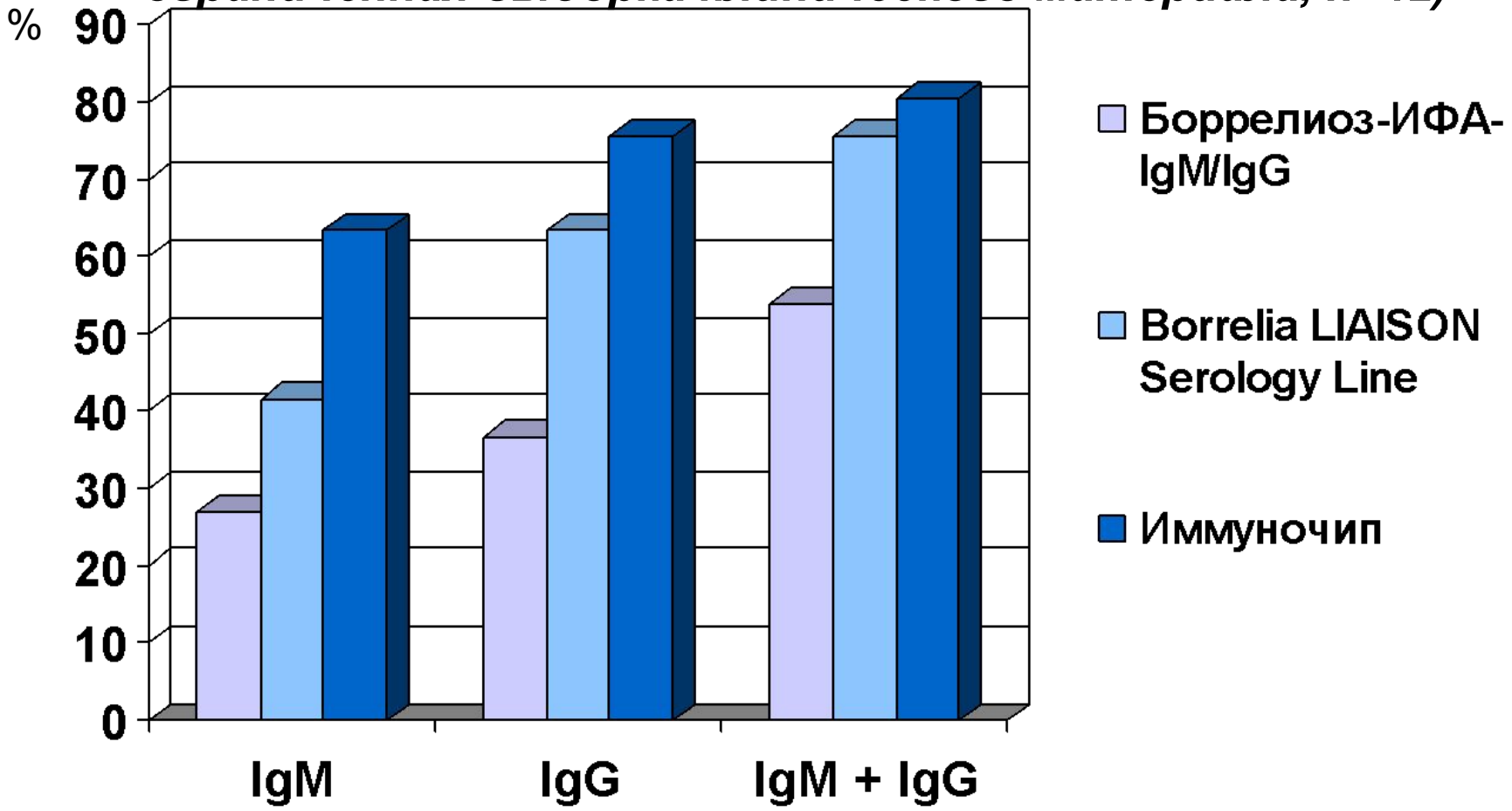
Чувствительность и специфичность иммуночипа для серодиагностики ИКБ

(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	+ VlsE *B. afzelii*, p41int *B. afzelii*, p17 *B.afzelii*	- (4 балла) p41int *B. afzelii*, p41int *B. garinii*
989-3	+ OspC *B. garinii*	+ (8 баллов) OspC
902-2	+ OspC *B. garinii*, OspC *B. afzelii*	+ (8 баллов) OspC
903-1	+ VlsE *B. garinii*, OspC *B. garinii*	- (3 балла) VlsE
934-3	+ p100 *B. afzelii*, p41 int *B. afzelii*, p39 *B. afzelii*, OspC *B. garinii*, p17 *B. afzelii*, p17 *B. garinii*	+ (11 баллов) VlsE, OspC
945-2	+ p41 int *B. afzelii*, p41 int *B. afzelii*, OspC *B. afzelii*, OspC *B. garinii*	- (4 балла) p41 int *B.afzelii*, p41 int *B. garinii*
1319-2	+ p41 int *B. afzelii*, p41 int *B. afzelii*, OspC *B. afzelii*, OspC *B. garinii*	сомнительный (5 баллов) p41, p41 int *B.afzelii*, p41 int *B. garinii*

Инфекции передаваемые клещами рода Ixodes

F.tularensis

Tick-borne encephalitis virus

Babesia

Ehrlichia muris, chaffeensis

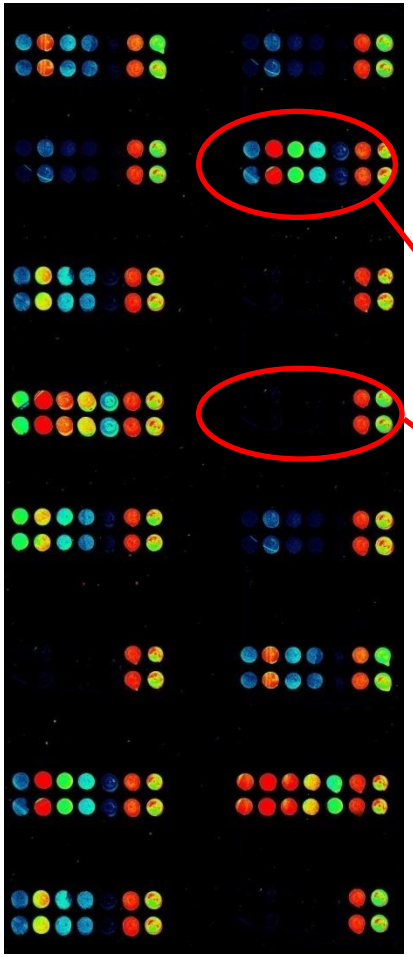
B. burgdorferi sl

Rickettsia

Anaplasma phagocytophi llum

C.burnetii

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



Тр 47	Тр 17	Тр 47	TmpA	кардио липин	К1	К2
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**

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2397178

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА В ФОРМАТЕ ИММУНОЧИПА И СПОСОБ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА

Патентообладатель(ли): *Федеральное государственное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (RU), Общество с ограниченной ответственностью "ИнтерЛабСервис" (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2009106931

Приоритет изобретения 27 февраля 2009 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации *20 августа 2010 г.*

Срок действия патента истекает 27 февраля 2029 г.

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам

Б.П. Симонов

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

Дизайн одного эррея для серологической диагностики TORCH-инфекций

GRA1 (p24) *T.gondii*	GRA7 (p29) *T.gondii*	MIC3 *T.gondii*	SAG 1 (p30) *T. gondii*	E1 *Rubella virus*	E2 *Rubella virus*	core *Rubella virus*	*BSA-Cy5/Cy3*
GRA1 (p24) *T.gondii*	GRA7 (p29) *T.gondii*	MIC3 *T.gondii*	SAG 1 (p30) *T. gondii*	E1 *Rubella virus*	E2 *Rubella virus*	core *Rubella virus*	*BSA-Cy5/Cy3*
pp 28 *CMV*	pp 38 *CMV*	pp 52 *CMV*	pp 65 *CMV*	pp 150 *CMV*	VP1 *B19 Parvovirus*	VP2 *B19 Parvovirus*	*BSA-Cy5/Cy3*
pp 28 *CMV*	pp 38 *CMV*	pp 52 *CMV*	pp 65 *CMV*	pp 150 *CMV*	VP1 *B19 Parvovirus*	VP2 *B19 Parvovirus*	*BSA-Cy5/Cy3*
gD1 *HSV-1*	gG1 *HSV-1*	gD2 *HSV-2*	gG2 *HSV-2*	p18 *EBV*	p54 (ENA) *EBV*	EBNA *EBV*	*BSA-Cy5/Cy3*
gD1 *HSV-1*	gG1 *HSV-1*	gD2 *HSV-2*	gG2 *HSV-2*	p18 *EBV*	p54 (ENA) *EBV*	EBNA *EBV*	*BSA-Cy5/Cy3*
Внутренние контроли (human IgG/IgM)							*BSA-Cy5/Cy3*
Внутренние контроли (human IgG/IgM)							*BSA-Cy5/Cy3*
Внутренние контроли (anti - human IgG/IgM)							*BSA-Cy5/Cy3*
Внутренние контроли (anti - human IgG/IgM)							*BSA-Cy5/Cy3*
BSA-Cy5/Cy3	*BSA-Cy5/Cy3*	*BSA-Cy5/Cy3*	*BSA-Cy5/Cy3*	*BSA-Cy5/Cy3*	*BSA-Cy5/Cy3*	*BSA-Cy5/Cy3*	*BSA-Cy5/Cy3*

Флуоресцентная детекция спектра антител разных классов: IgG и IgM

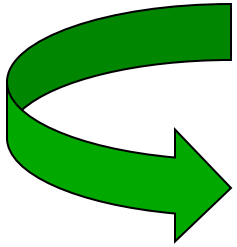
Канал Cy3

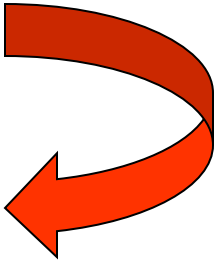
конъюгат анти-IgM человека-Cy3

+

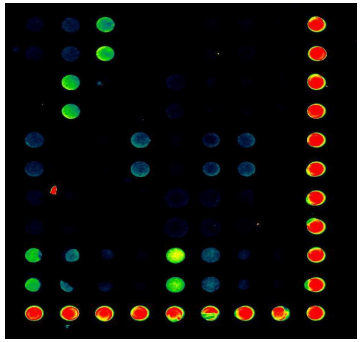
Канал Cy5

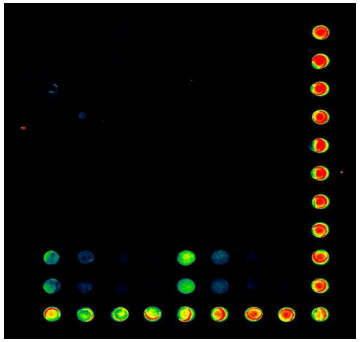
конъюгат анти-IgM человека-Cy3



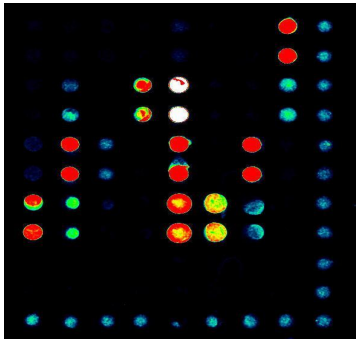


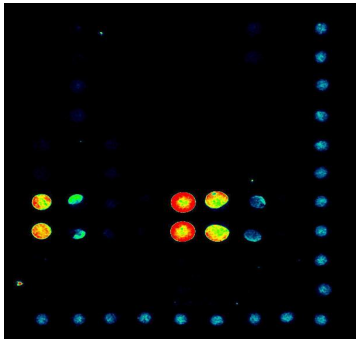
+ -





+ -

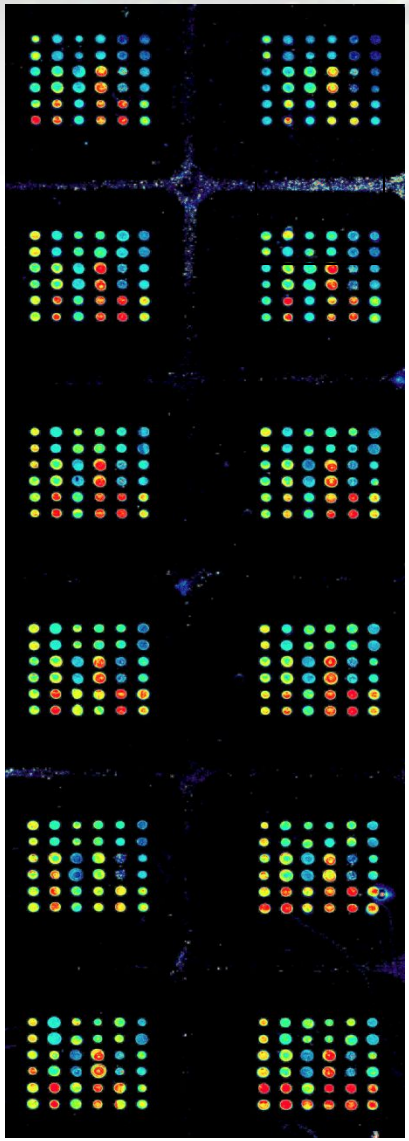




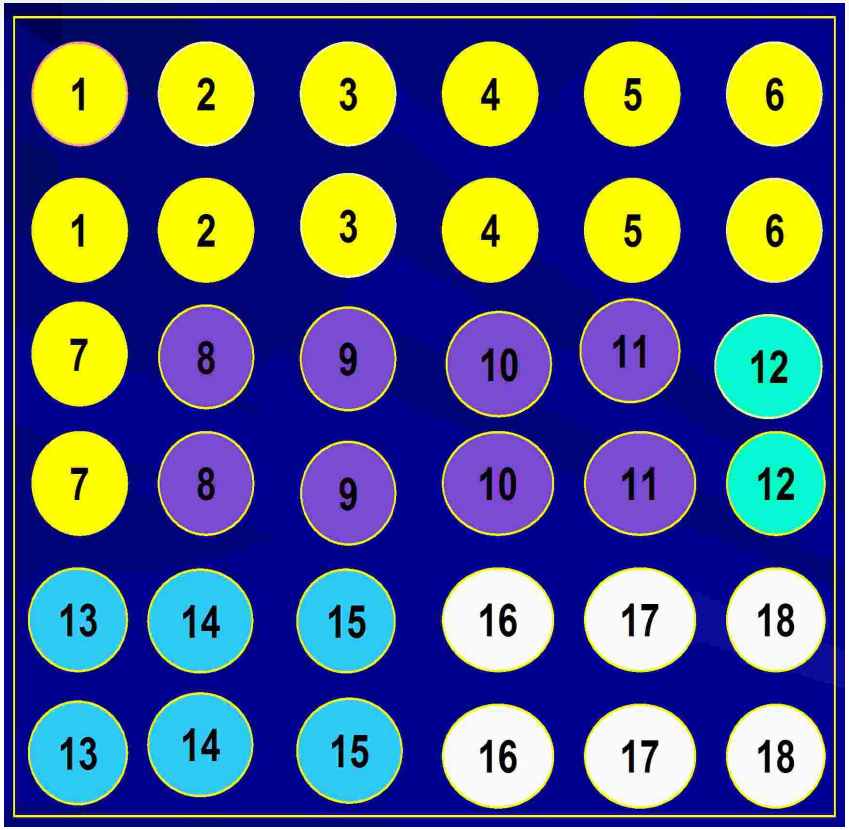
Совпадение результатов, полученных в иммуночипе, с данными ИФА при тестировании сывороток (всего- 700 шт)

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

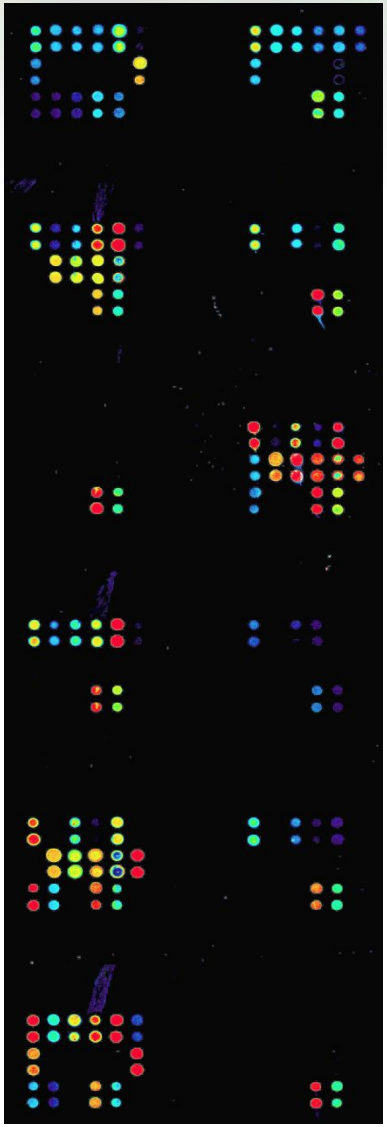
Определение значимых маркеров к ВИЧ 1 и 2 типов, ВГС, сифилису



Канал внутреннего контроля - FITC



gp120, gp160, gp41, pol, gag, env(ВИЧ2), AT p24, core, NS3, NS4, NS5, Tp47, Tp17, Tp15, TmpA, IgG, анти-IgG, буфер



Канал учета специфической реакции – Cy5

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

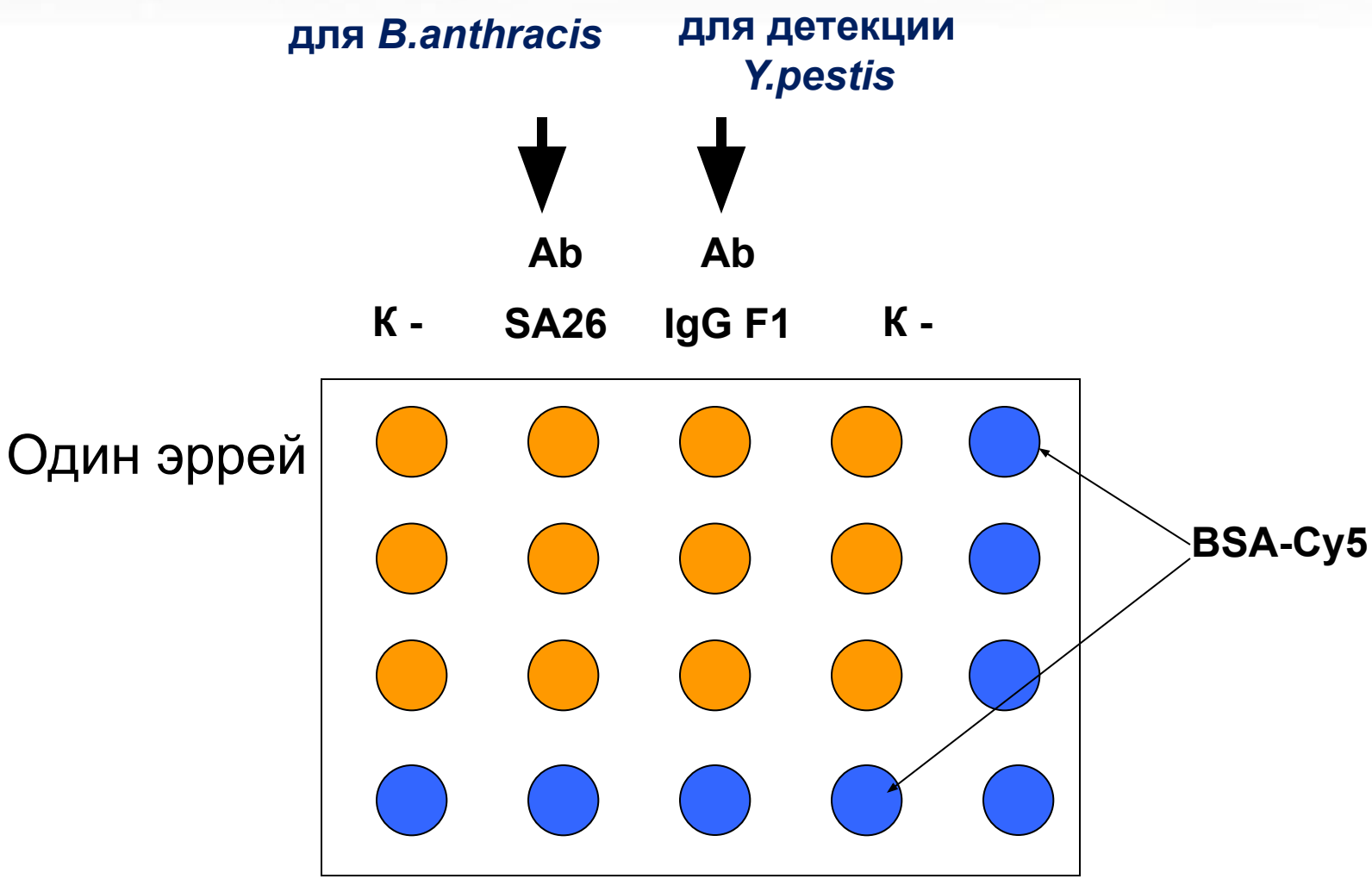
Исследуемые образцы	Кол-во	Кол-во ВИЧ-положительных образцов	Кол-во анти-ВГС-положительных образцов	Кол-во образцов содержащих, антитела к сифилису
- от больных сифилисом	**385**	**41**	**35**	**380 (5 – н/о)**
- ОСО ВИЧ-1(+)	**16**	**16**	**0**	**0**
- ОСО ВИЧ-2 (+)	**8**	**8**	**0**	**0**
- ОСО ВГС (№№1-16 +)	**16**	**0**	**16**	**0**
- от больных ВГС	**400**	**56**	**392 (8 – н/о)**	**22**
- от ВИЧ-инфицирован-ных	**465**	**461 (4 – н/о)**	**188**	**45**
Чувствитель-ность, %		**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.anthracis, Y.pestis)*

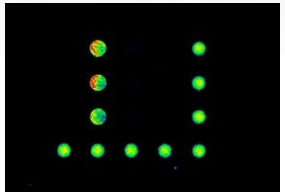
(ФЦП «Национальная система химической и биологической безопасности РФ“)



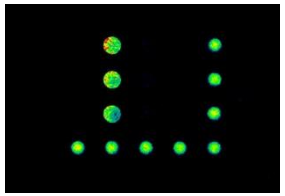
Примеры флуоресцентных паттернов. Аналитическая чувствительность

B. anthracis

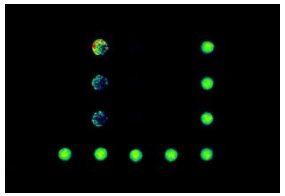
10^{7} cells/ml



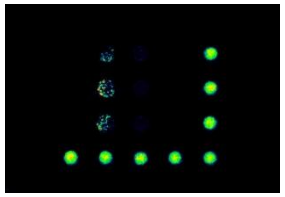
10^{6} cells/ml



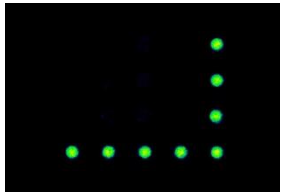
10^{5} cells/ml



10^{4} cells/ml

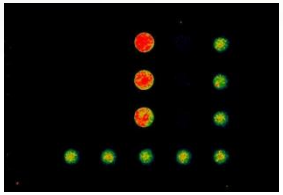


10^{3} cells/ml

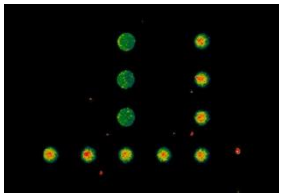


Y.pestis

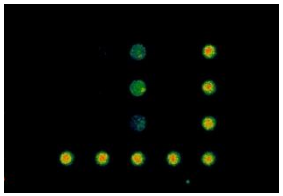
10^{7} cells/ml



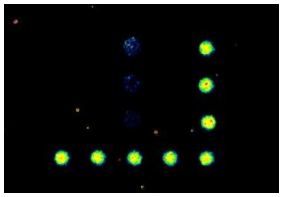
10^{6} cells/ml



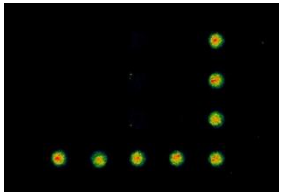
10^{5} cells/ml



10^{4} cells/ml



10^{3} cells/ml



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

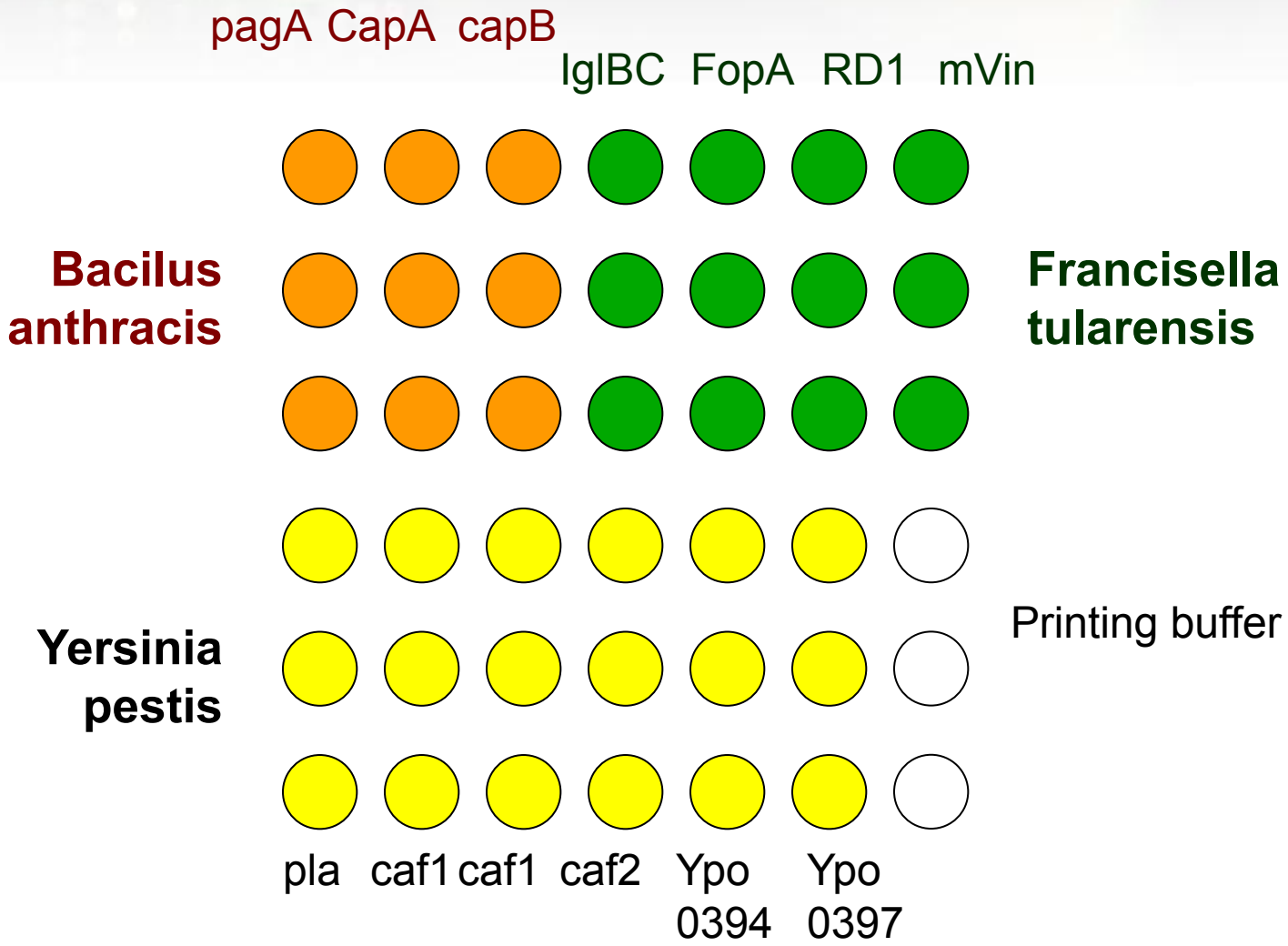


Схема анализа с помощью ДНК-чипа

пробо-подготовка

Выделение ДНК из материала

↓

ПЦР-амплификация

последовательность промотора T7-RNA полимеразы включена в структуру обратных праймеров

↓

Транскрипция (15-30 мин)

↓

Гибридизация на DHK-чипе (30 мин)

on-chip анализ

↓

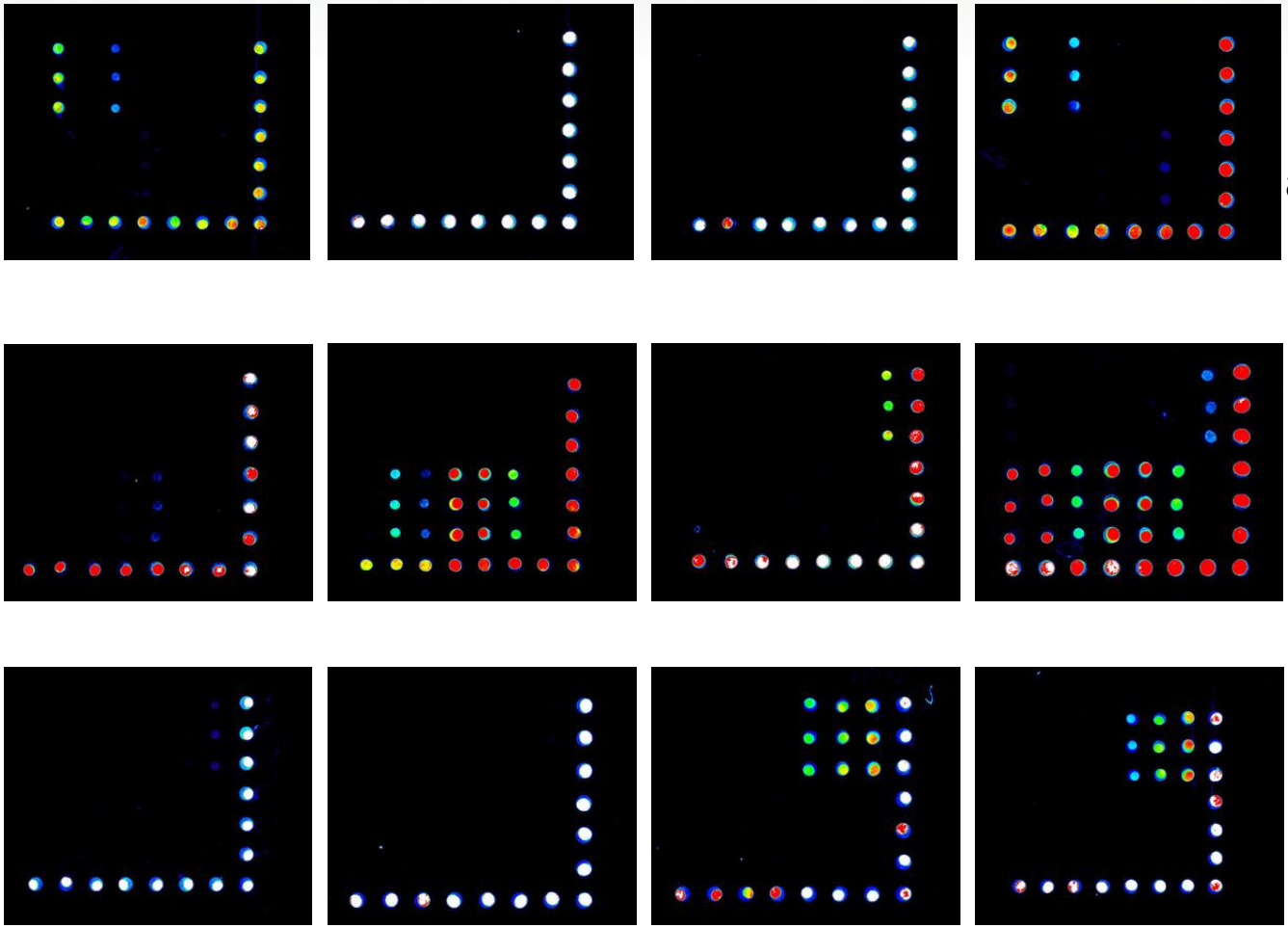
Детекция положительных сигналов на чипе с использованием стрепатавидин-Cy5 (15-20 мин)

↓

Сканирование и анализ результатов

Примеры флуоресцентных паттернов после гибридизации на ДНК-чипе

Материал



Штамм B. anthracis

Y.pestis антиген

F.tularensis штамм

B.a. mix

Y.p. mix

F.t. mix

B.a.+ Y.p + F.t. mix

Праймеры

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!