

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*

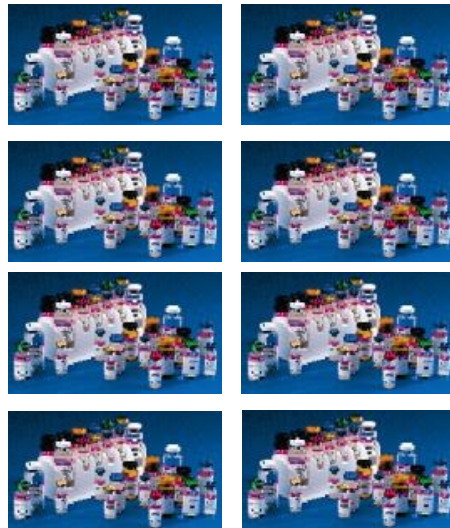
Разработка тест-систем в формате иммуночипа для диагностики инфекционных, аллергических и аутоиммунных заболеваний



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

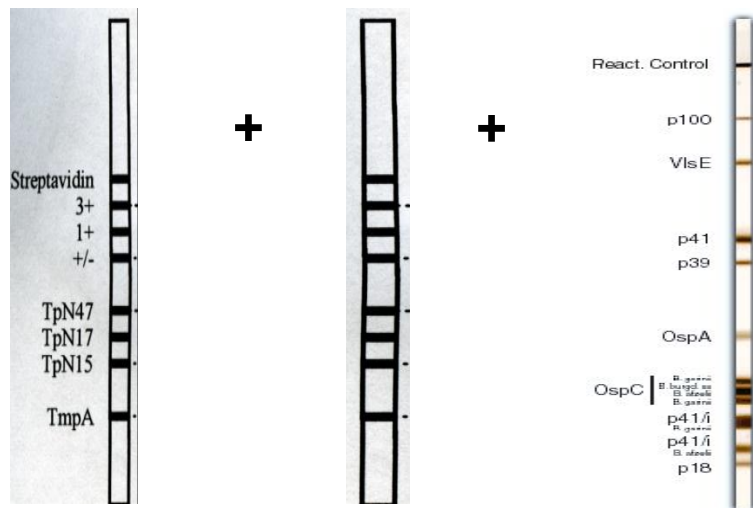


Иммуночип

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



VS

Иммуночип



Технологии не для каждой лаборатории

Evidence (RANDOX)

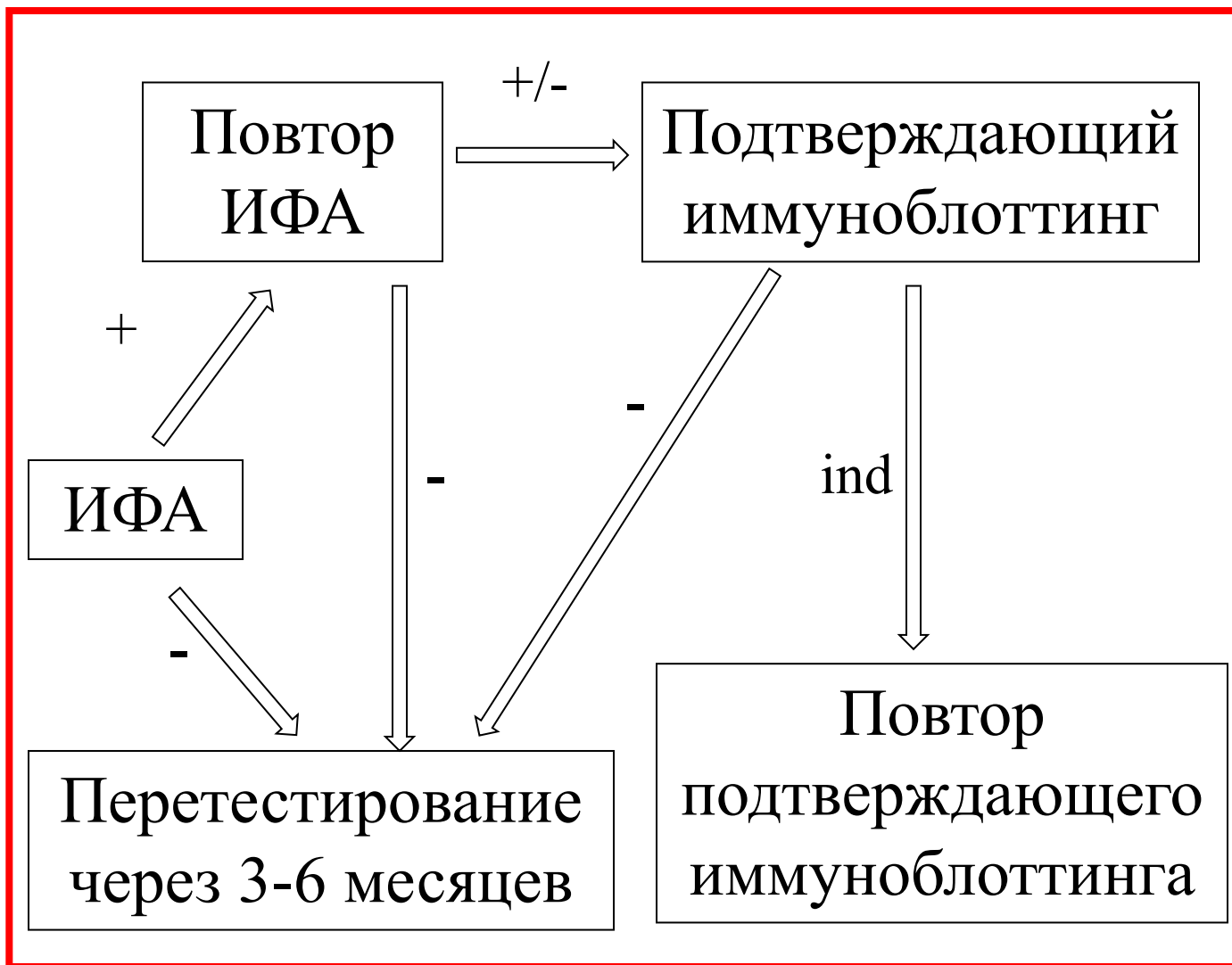


BioPlex (BIO-RAD)



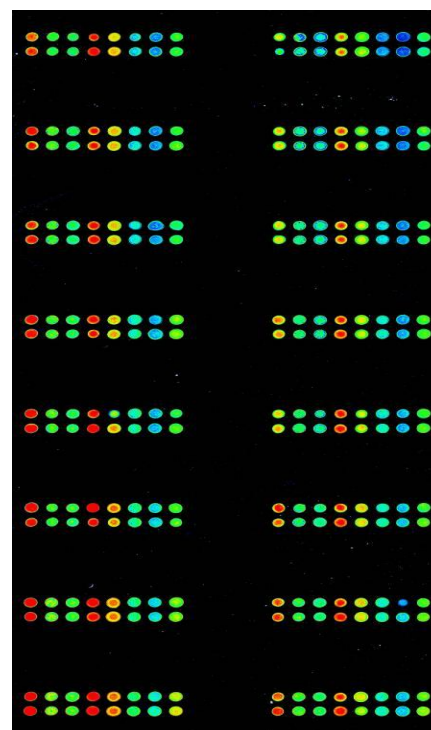
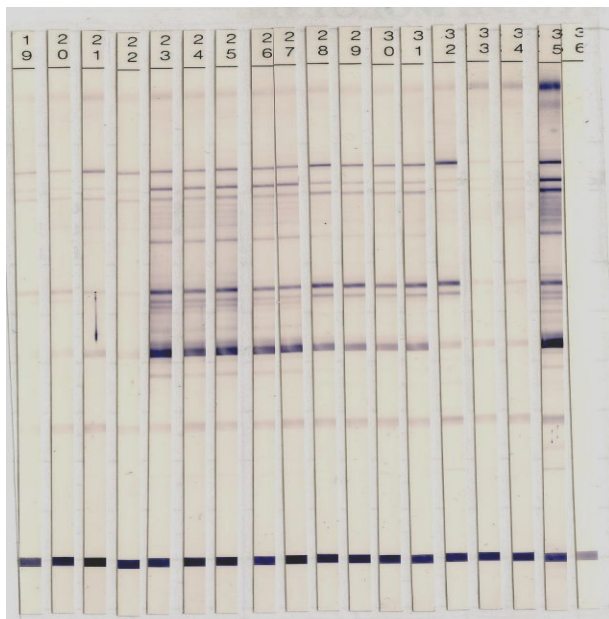
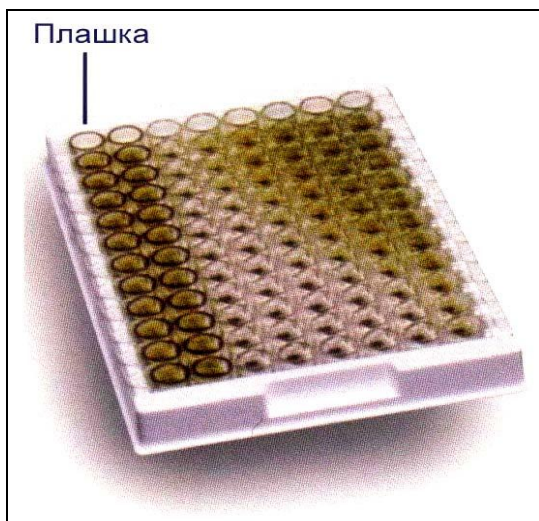
+	-
Автоматическое процессирование	Очень дорогие тест-системы и оборудование
Мультиплексность анализа (до 500 параметров)	Дорогое техническое обслуживание

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



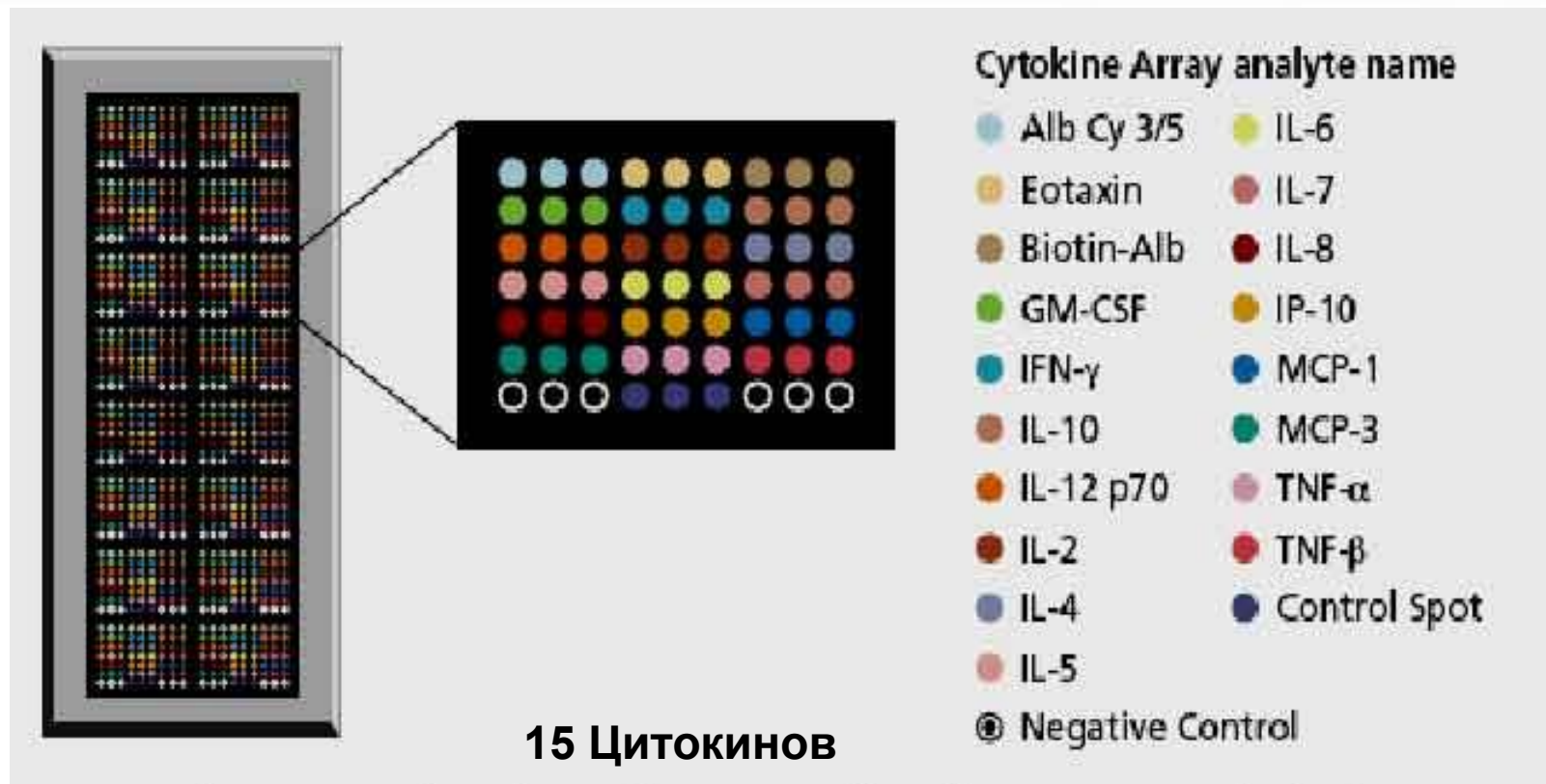
Иммуночип

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

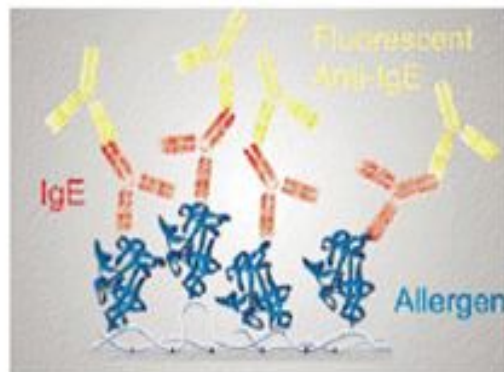
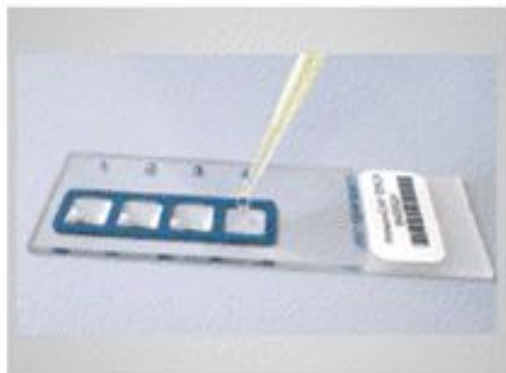


сопоставимый (или >) по чувствительности с ИФА, а по специфичности с иммуноблотом

Принципиальное отличие биочипов – возможность выявления в одном анализе множества маркеров

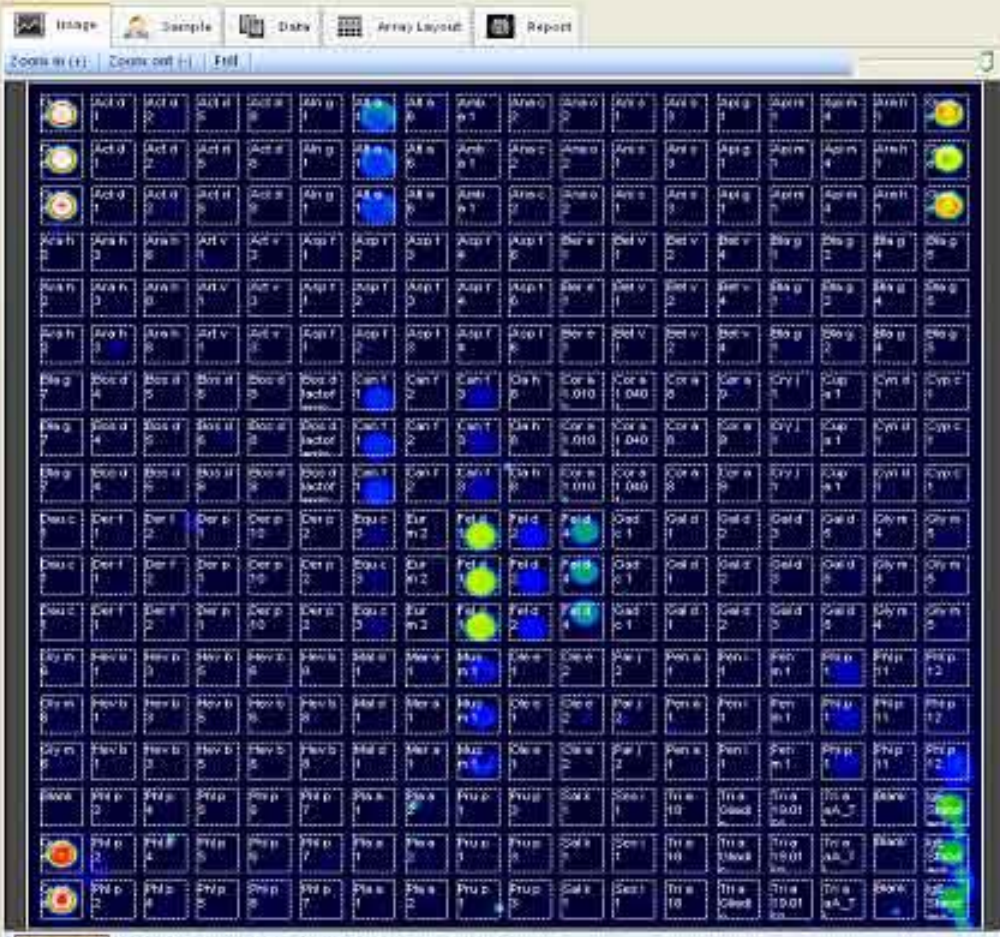


Аллергочип ImmunoCAP ISAC IgE



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

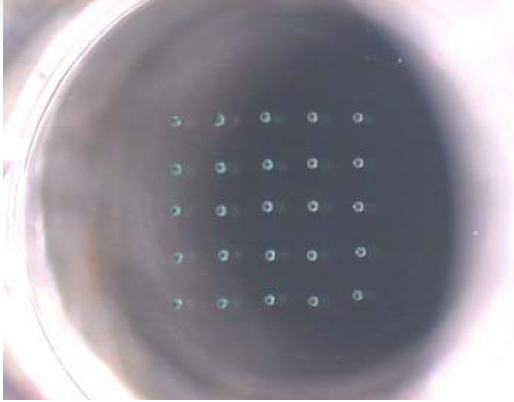
- Load results
- Scan images
- Load images
- Results
- Calibration
- Export
- Shut down



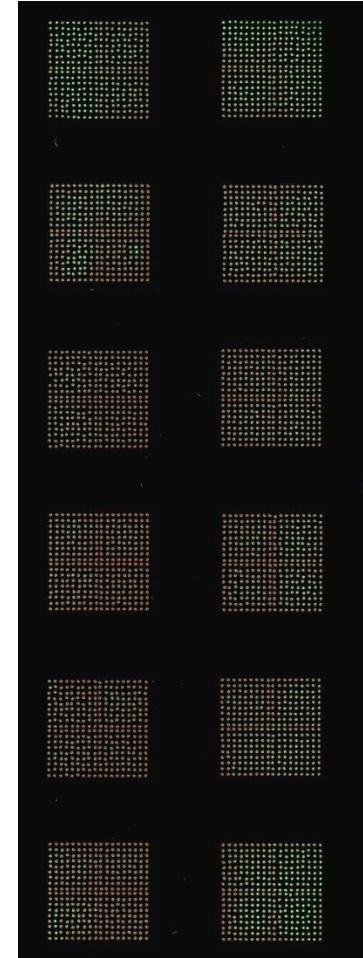
ID	Barcode	Pos	Sample Code
AD	OB11924	1	OB11924_1
AD	OB11924	2	OB11924_2
AD	OB11924	3	OB11924_3
AD	OB11924	4	OB11924_4
Failed	OB12024	1	OB12024_1
Failed	OB12024	2	OB12024_2
Failed	OB12024	3	OB12024_3
Failed	OB12024	4	OB12024_4
Failed	OB12124	1	OB12124_1
Failed	OB12124	2	OB12124_2
Failed	OB12124	3	OB12124_3
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
AD	OB12524	1	OB12524_1
AD	OB12524	2	OB12524_2
AD	OB12524	3	OB12524_3
AD	OB12524	4	OB12524_4

Method: Specificity:

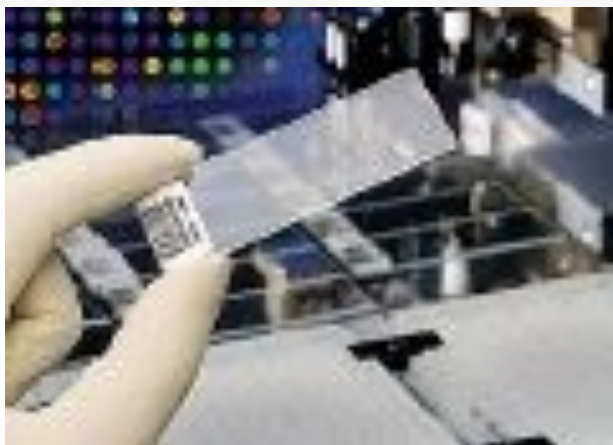
Новая технология бесконтактной микропечати с помощью современных наноплоттеров



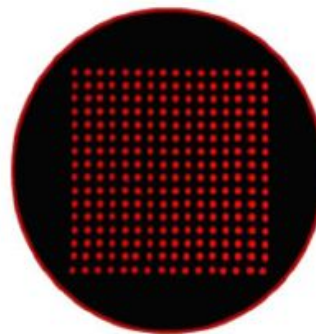
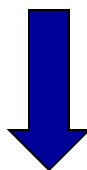
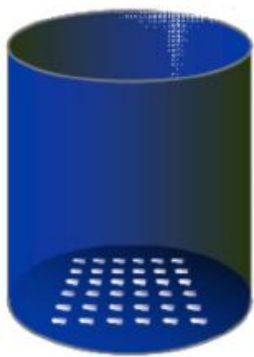
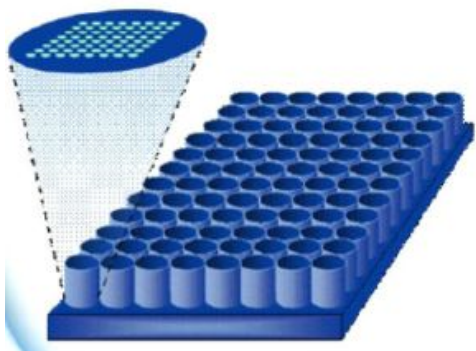
*Позволяют печатать
на слайды или дно лунок
планшетов*



1 чип (слайд) = 1 образец



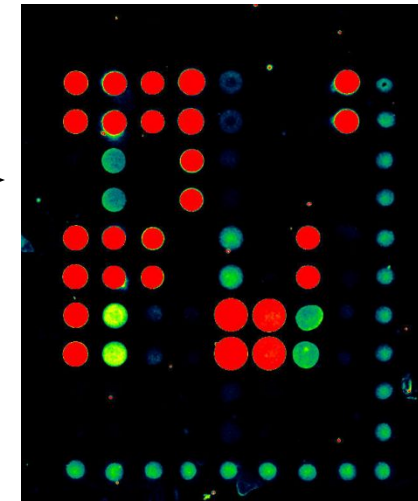
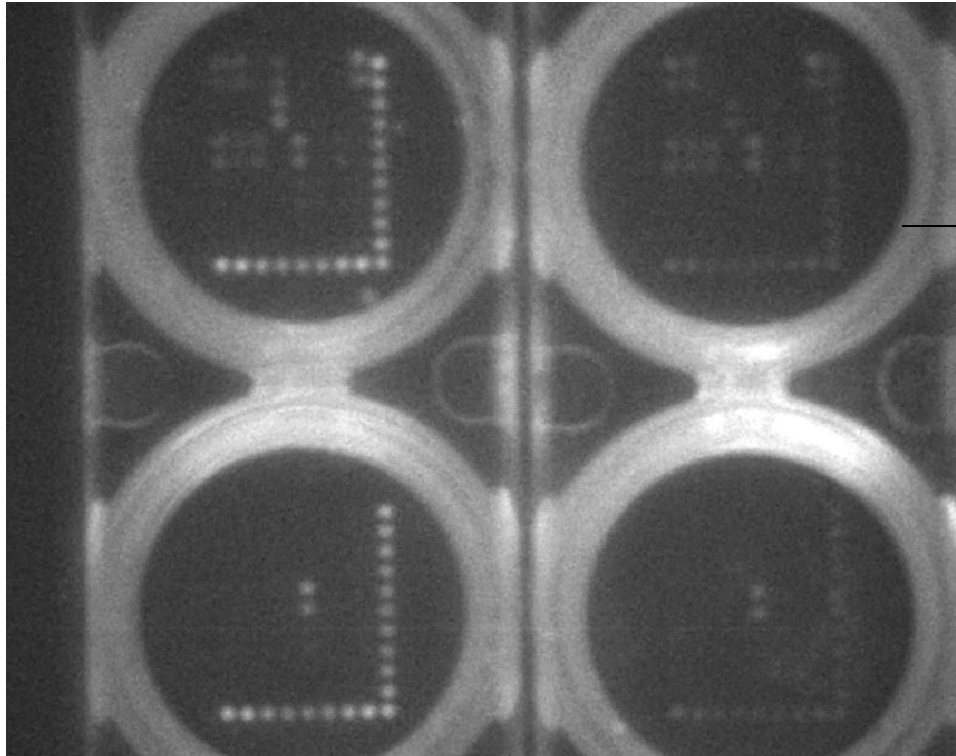
1 слайд = 16 образцов, $16 \times 4 = 64$ образца



1 планшет = 96 образцов



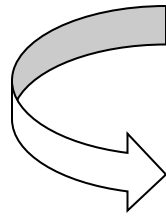
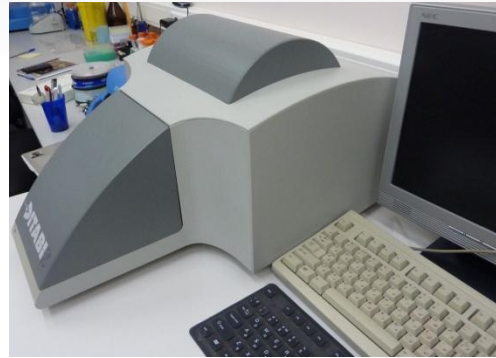
Иммуносорбенты для планарных чипов высокой плотности – активированные микроскопные слайды и полистироловые планшеты



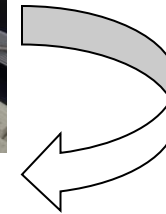
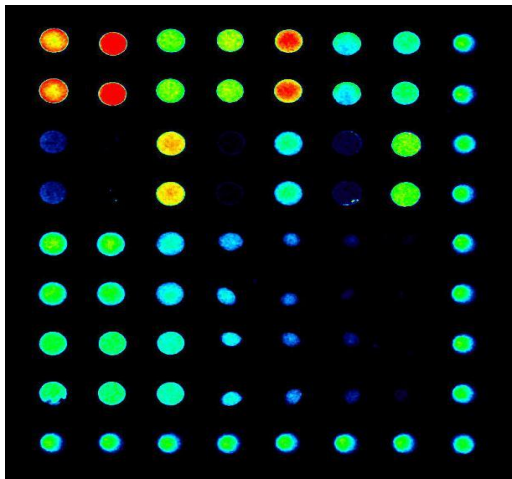
Флуоресцентный профиль
эрея на альдегидном слайде

Эрей – лунка планшета

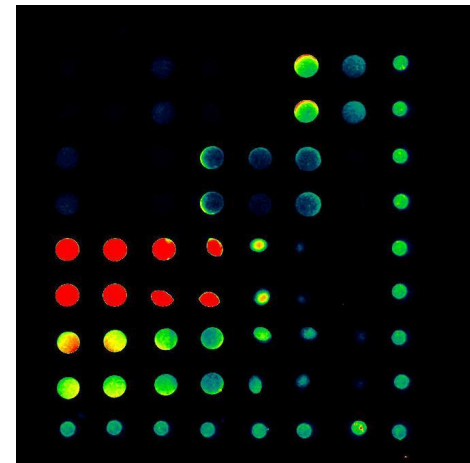
Детекция антител разных классов в одной постановке в одном эррее



КАНАЛ Cy5
(антитела IgG)

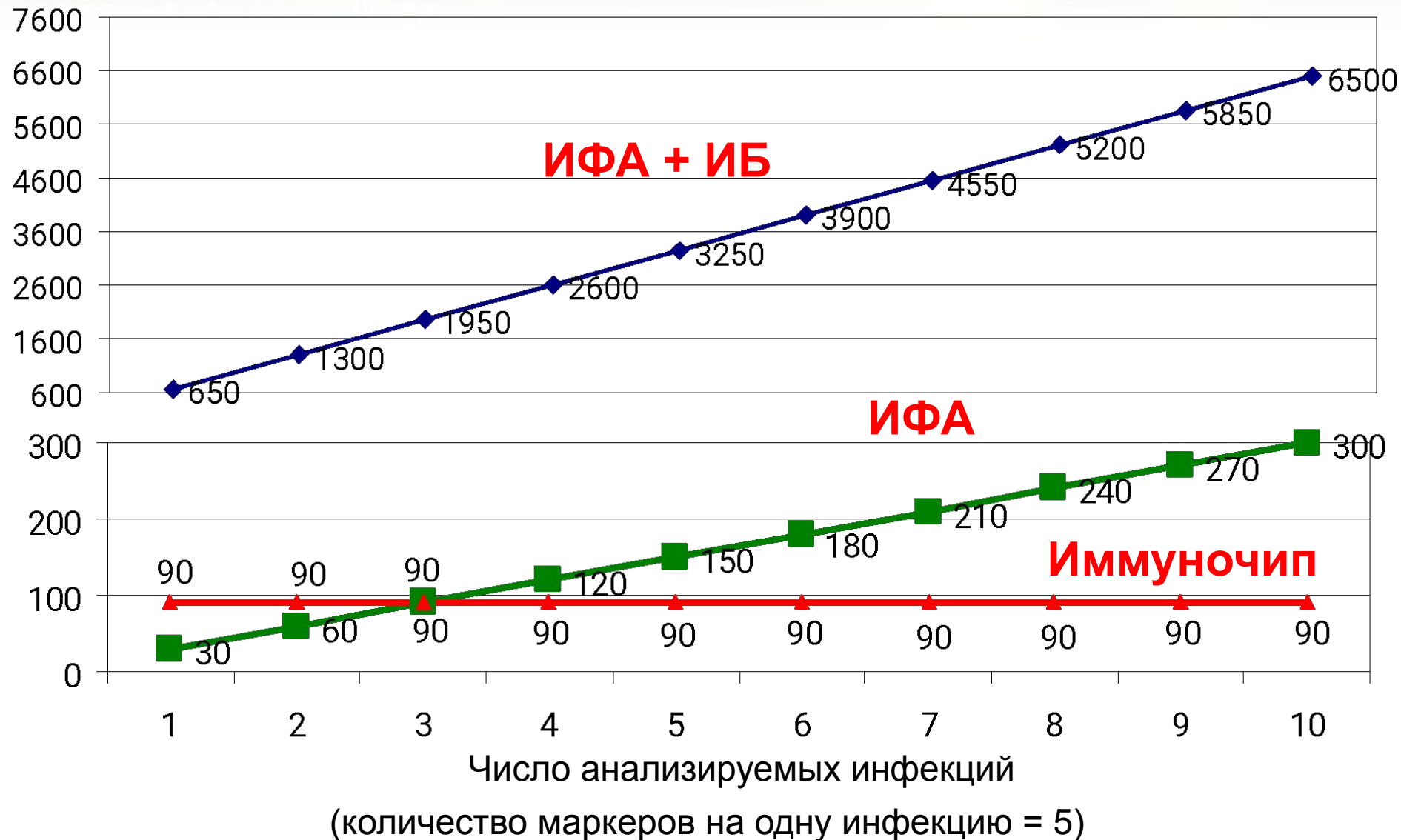


КАНАЛ Cy3
(антитела IgM)

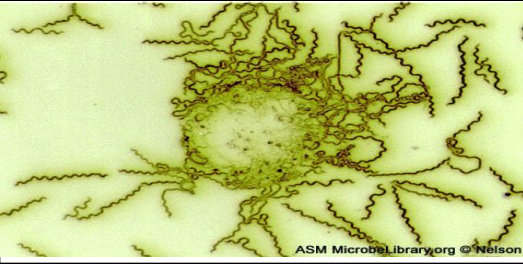



Себестоимость анализа при использовании разных серологических методов

руб



Принципы размещения антигенов и антител на одном иммуночипе

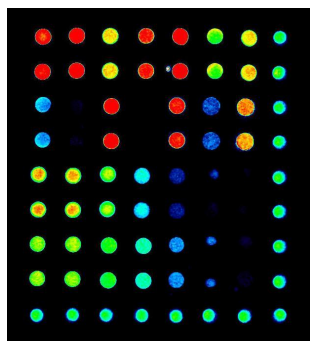
<p>Микроорганизмы, имеющие перекрестно-реагирующие антигены</p>	<p>Инфекции, вызываемые патогенными спирохетами</p>	 <p>ASM Microbiolibrary.org © Nelson</p>
<p>Микроорганизмы, имеющие одинаковые пути передачи</p>	<p>Трансфузионные инфекции</p>	
<p>Микроорганизмы, вызывающие сходную патологию</p>	<p>АФС, 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**

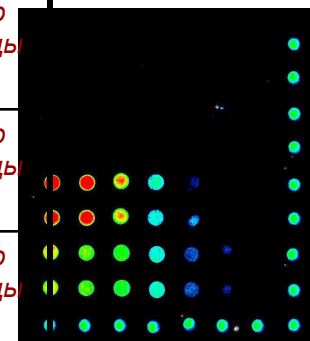
Дизайн эррея иммуночипа для серодиагностики Лайм-боррелиоза

+



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

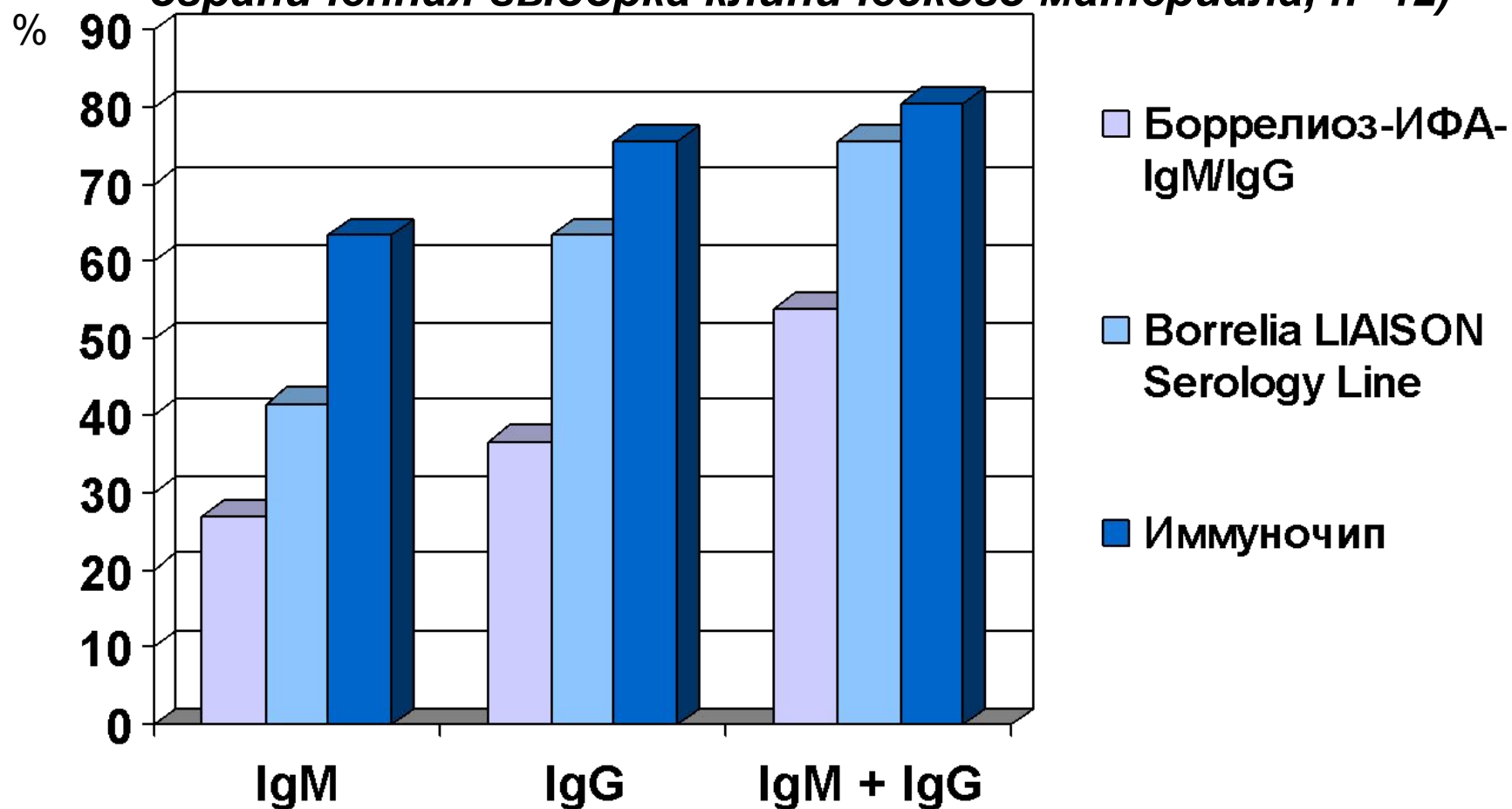
	IgM	IgG	IgM + IgG
1 стадия (n = 159)	60,1 %	48,6 %	87,3 %
2 + 3 стадии (n = 201)	55,7 %	88,6 %	97,1 %
специфичность (n = 495)	96,4%	97,2%	

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



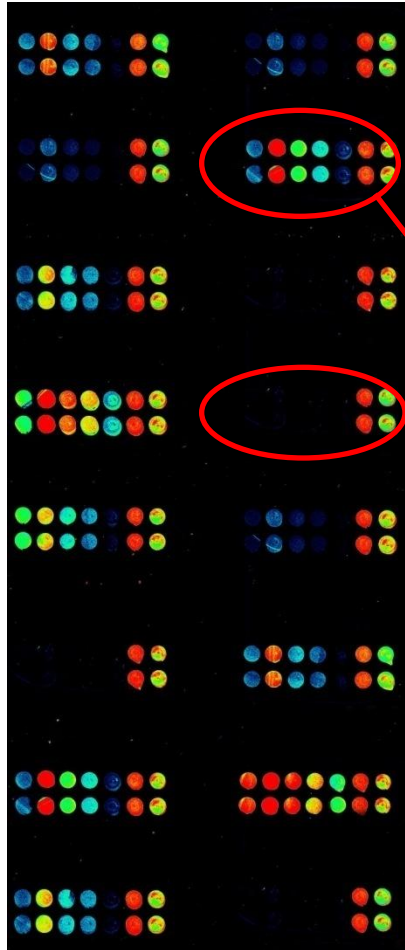
B.
burgdorferi s.l

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***

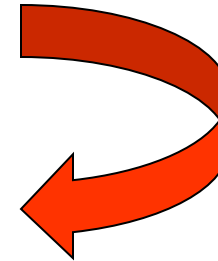
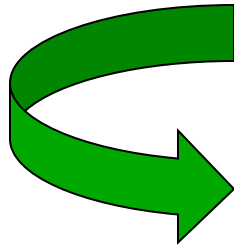
Флуоресцентная детекция спектра антител разных классов: IgG и IgM

Канал Cy3

Канал Cy5

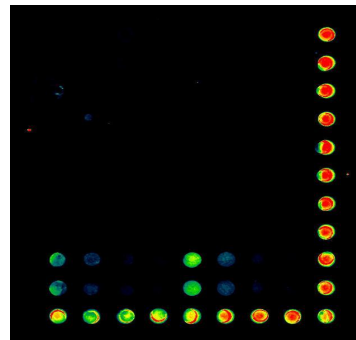
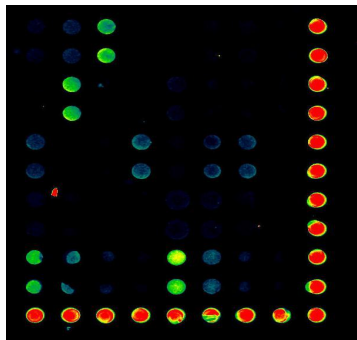
конъюгат анти-IgM человека-Cy3

+ конъюгат анти-IgM человека-Cy3



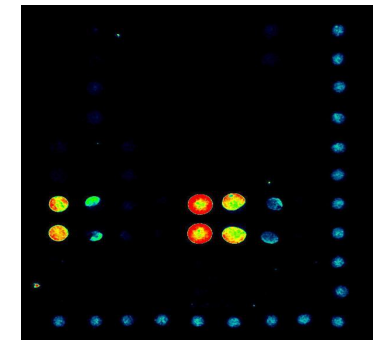
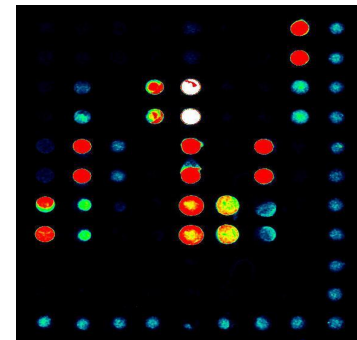
+

-



+

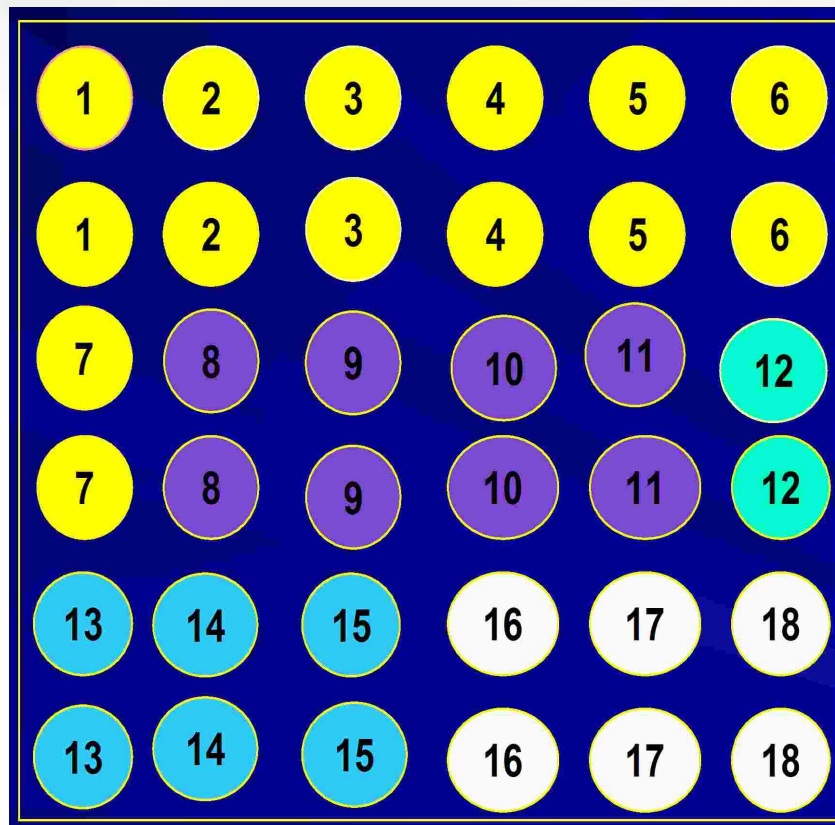
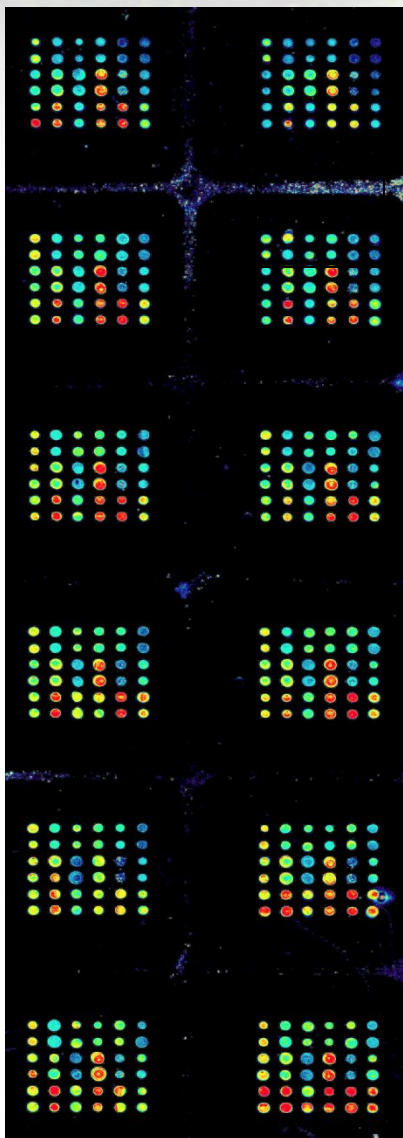
-



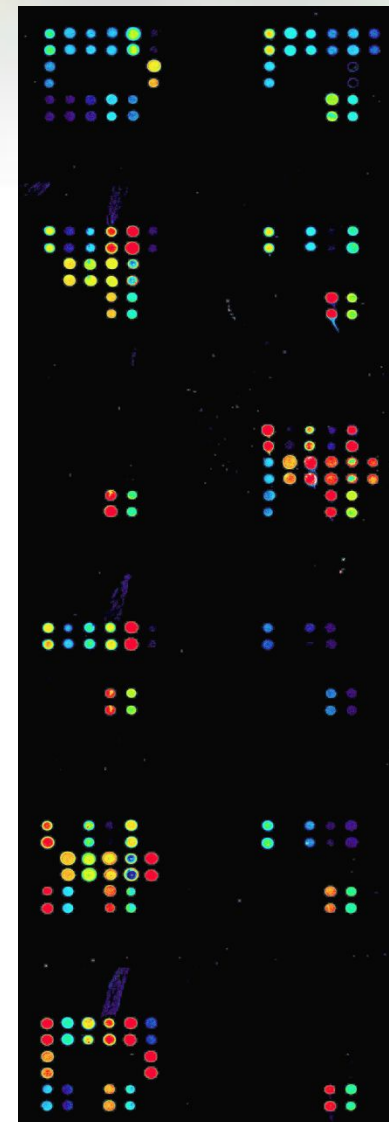
**Совпадение результатов, полученных в иммуночипе,
с данными ИФА при тестировании сывороток
(всего- 700 шт)**

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)

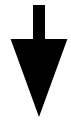
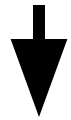
Исследуемые образцы	Кол-во	Кол-во ВИЧ-положительных образцов	Кол-во анти-ВГС-положительных образцов	Кол-во образцов содержащих, антитела к сифилису
- от практически здоровых доноров	400	1	2	2
- ОСО ВИЧ (-)	20	0	0	0
- ОСО ВГС (№№ 17-24 -)	8	0	0	0
- от лиц с аутоиммунными заболеваниями	50	1	2	1
- от инфекционных 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

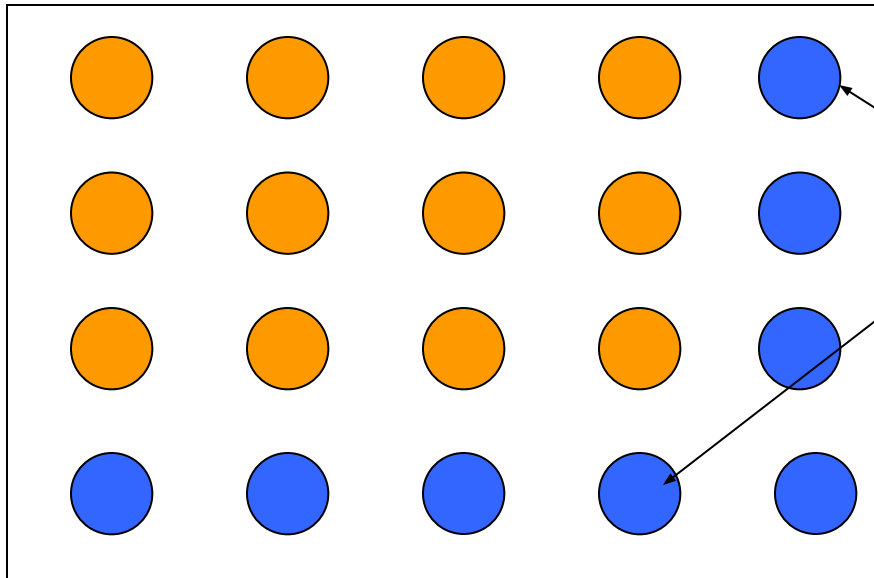
К -

SA26

IgG F1

К -

Один эррей

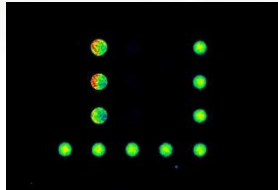


BSA-Cy5

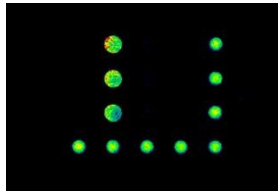
Примеры флуоресцентных паттернов. Аналитическая чувствительность

B. anthracis

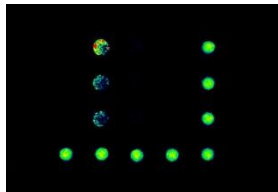
10^7 cells/ml



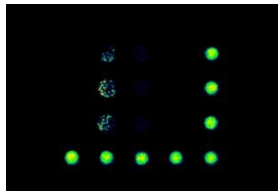
10^6 cells/ml



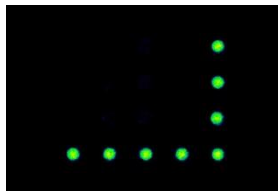
10^5 cells/ml



10^4 cells/ml

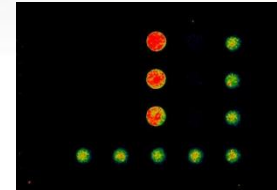


10^3 cells/ml

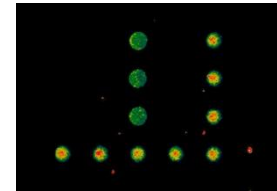


Y. pestis

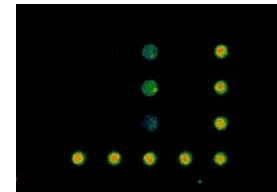
10^7 cells/ml



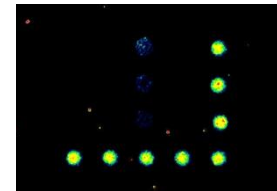
10^6 cells/ml



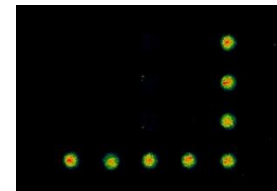
10^5 cells/ml



10^4 cells/ml



10^3 cells/ml



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

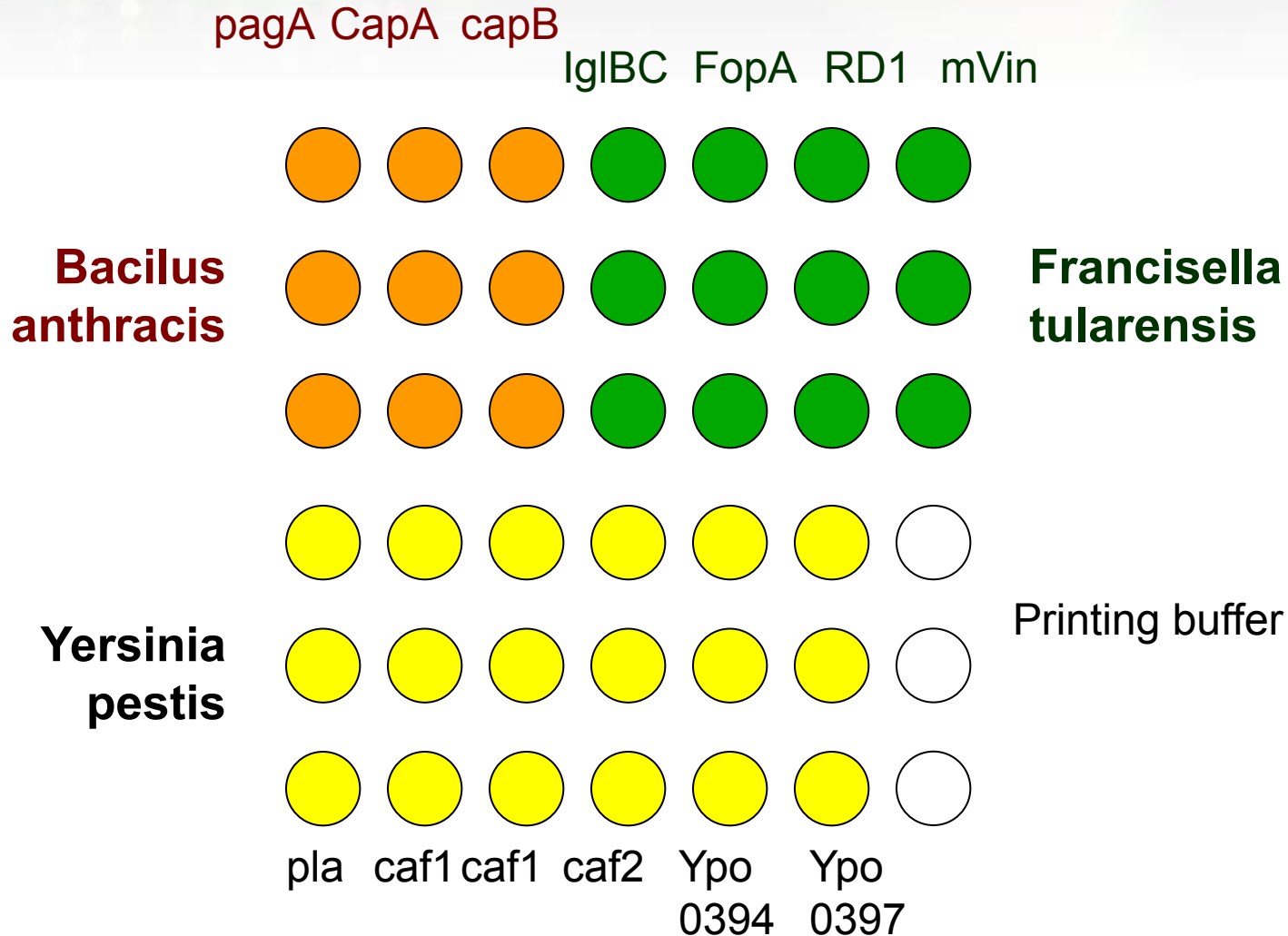
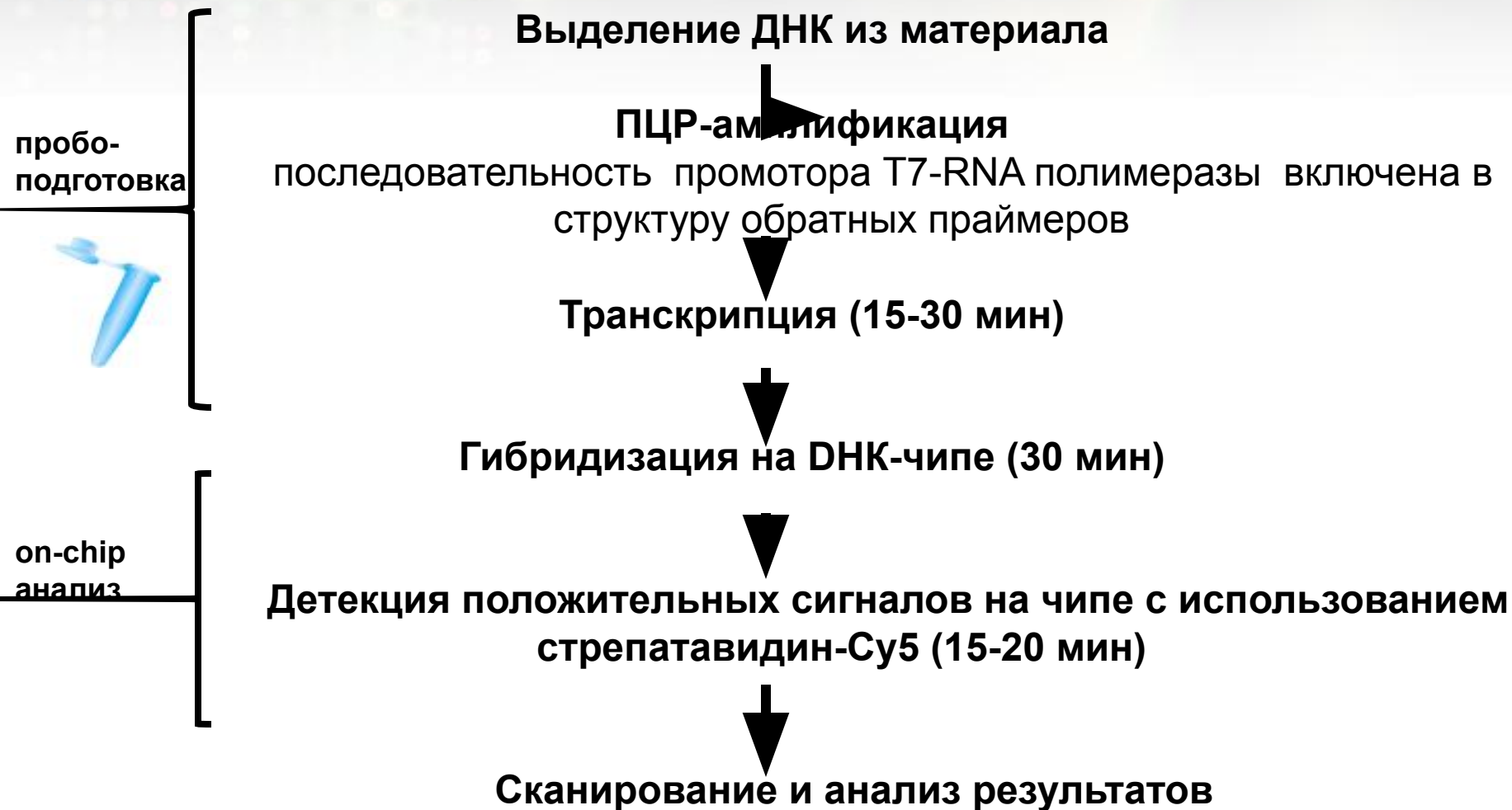
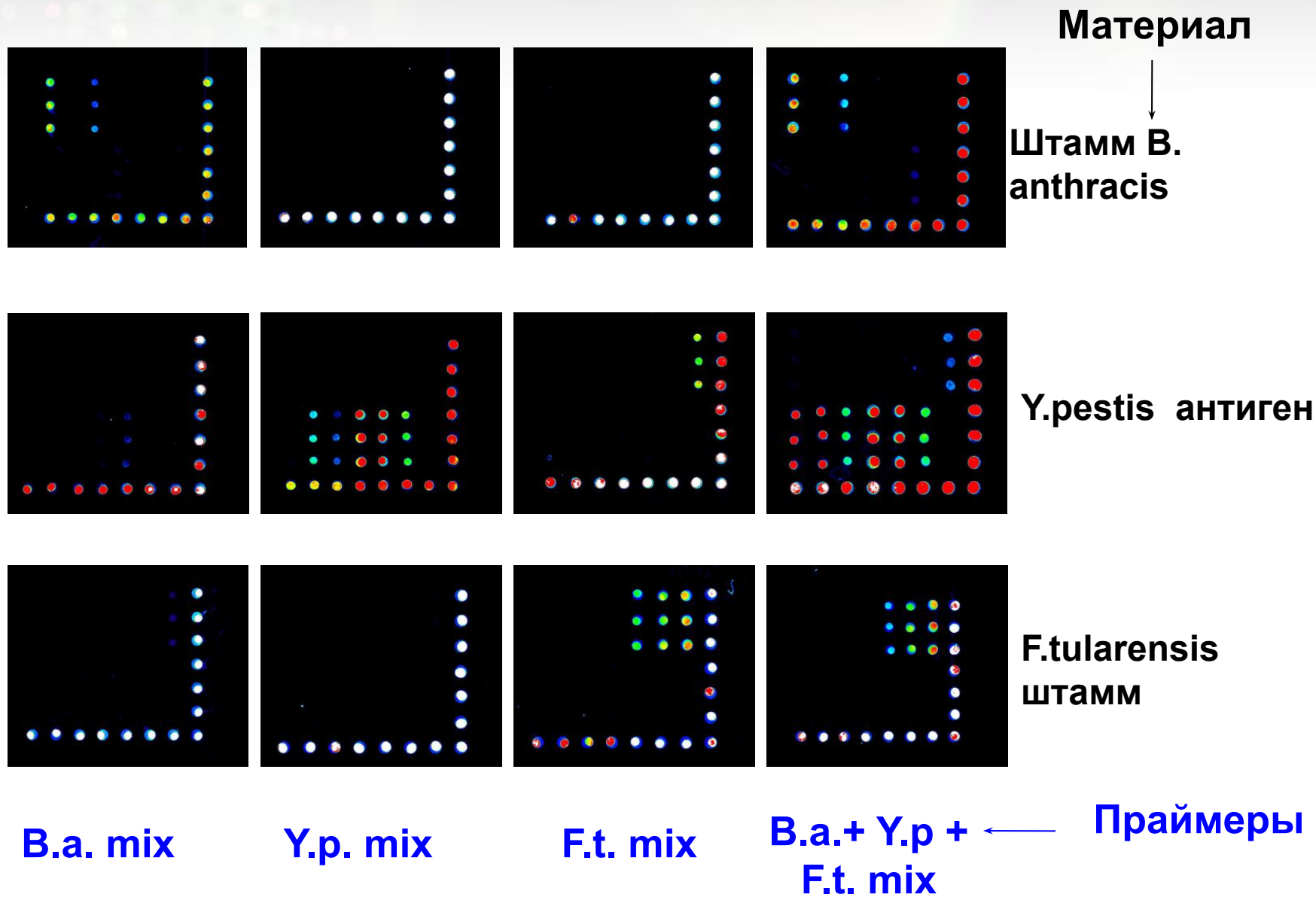


Схема анализа с помощью ДНК-чипа



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!