

*31 сессия НСАХ
Звенигород, 12-17 ноября 2006 г.*

**Экспрессные иммуноаналитические системы
для детекции биологически активных
соединений**

Б.Б. Дзантиев

Институт биохимии РАН

ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

- **Твердофазные (ИФА, РИА, ФИА и др.)**
- **Гомогенные (ПФИА, ЕМІТ и др.)**
- **Мембранные**
- **Агглютинационные**
- **Иммуносенсоры**
- **Иммуночипы**

Методы получения антител

- Иммунизация животных
(поликлональные антитела)
- Гибридомная технология
(моноклональные антитела)
- Фаговая библиотека
(мини-антитела)
- Molecular imprinting polymers
(“искусственные” антитела)

КЛАССЫ ОПРЕДЕЛЯЕМЫХ АНТИГЕНОВ

Гаптены:

- Пестициды
- Сурфактанты (ПАВ)
- Стероидные гормоны
- Наркотики

Белки:

- Иммуноглобулины
- Сывороточные белки
- Ферменты

Корпускулярные антигены:

- Вирусы
- Бактериальные клетки

Характеристики разработанных методом ИФА токсичных соединений

Антиген	Порог детекции, нг/мл	Время анализа, час.
Малатион	10	3
2,4-Д	2	1,5
Симазин	0,2	2
Атразин	0,1	2
Хлорсульфурон	0,1	2,5
Бутахлор	0,02	1,5
Нонилфенол	10	2
Сульфонамиды	0,1 – 5,0	2

ЭКСПРЕССНЫЕ МЕТОДЫ ИММУНОАНАЛИЗА

- **Инструментальные:**

 - Гомогенный ИФА

 - Поляризационный флуороиммуноанализ

 - Полиэлектролитный анализ

 - Проточно-инжекционный ИХА

 - Иммуносенсоры

- **Визуальные:**

 - Иммунофльтрация

 - Иммунохроматография

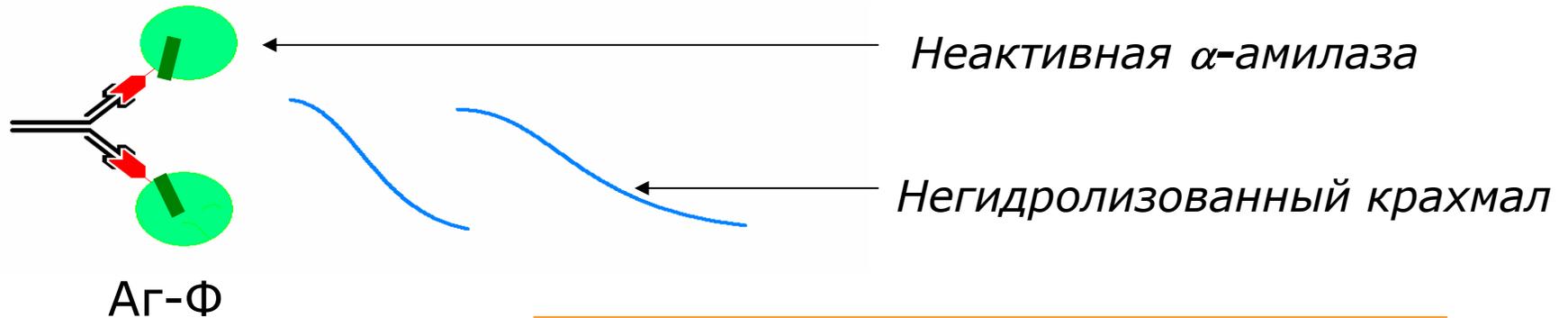
 - Латекс-агглютинация

A decorative graphic of a scroll with a red border and a light brown textured background. The scroll is unrolled in the center, with the top and bottom edges curled up. The text is centered within the unrolled portion.

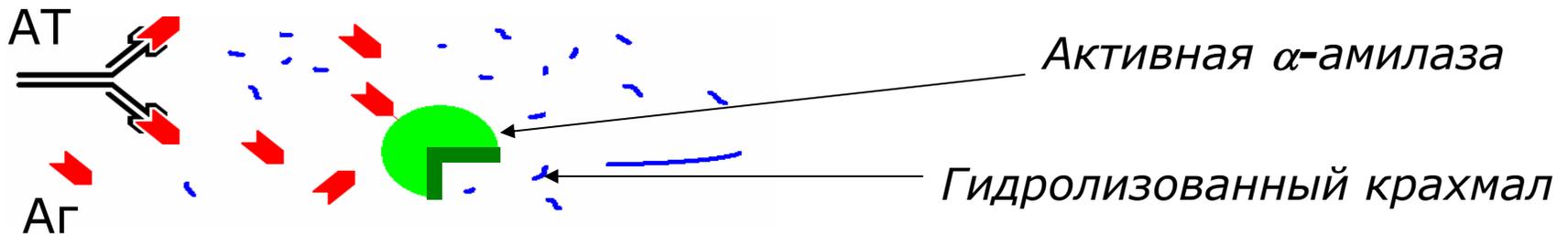
Гомогенный иммуноферментный анализ

Принцип гомогенного иммуноанализа с α -амилазой в качестве маркера

Отсутствие антигена в образце



Наличие антигена в образце



АТ – антитела против анализируемого антигена

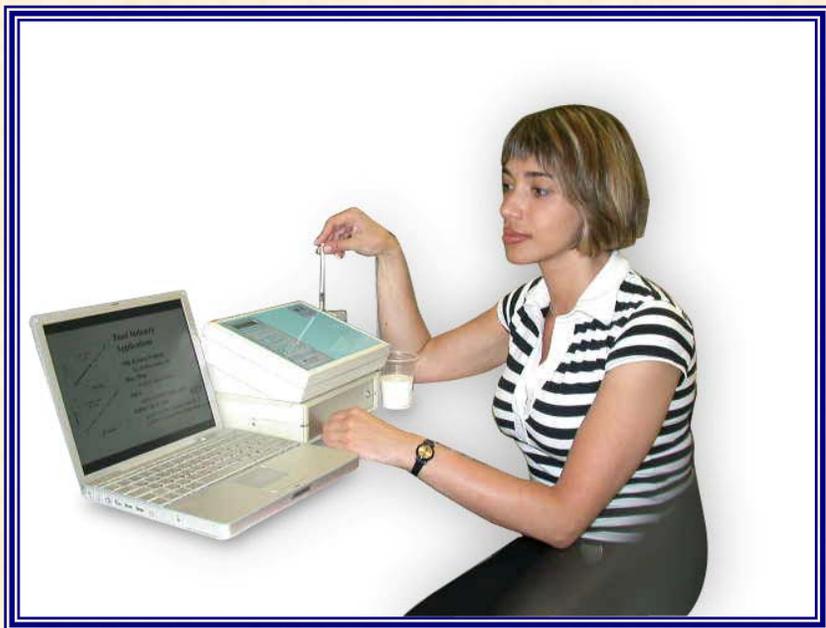
Аг – определяемые молекулы антигена

Аг-Ф – конъюгат антигена с α -амилазой

ГОМОГЕННЫЙ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ (ЕМІТ) ТЕСТОСТЕРОНА



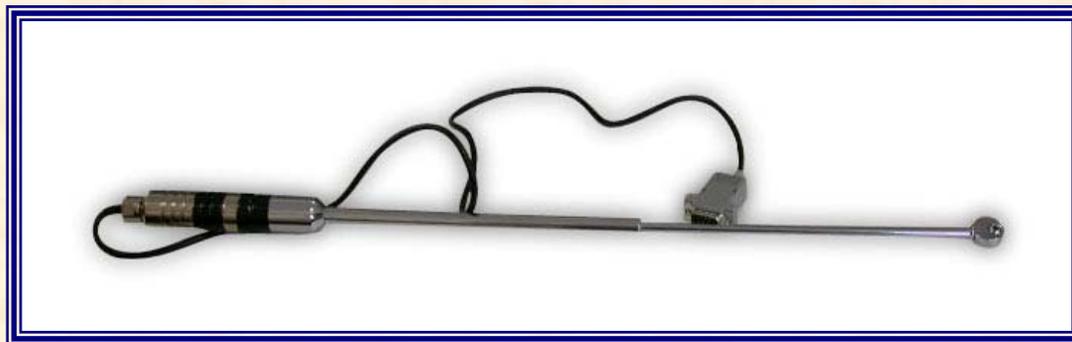
Модели ультразвуковых анализаторов



Портативный одноканальный
анализатор

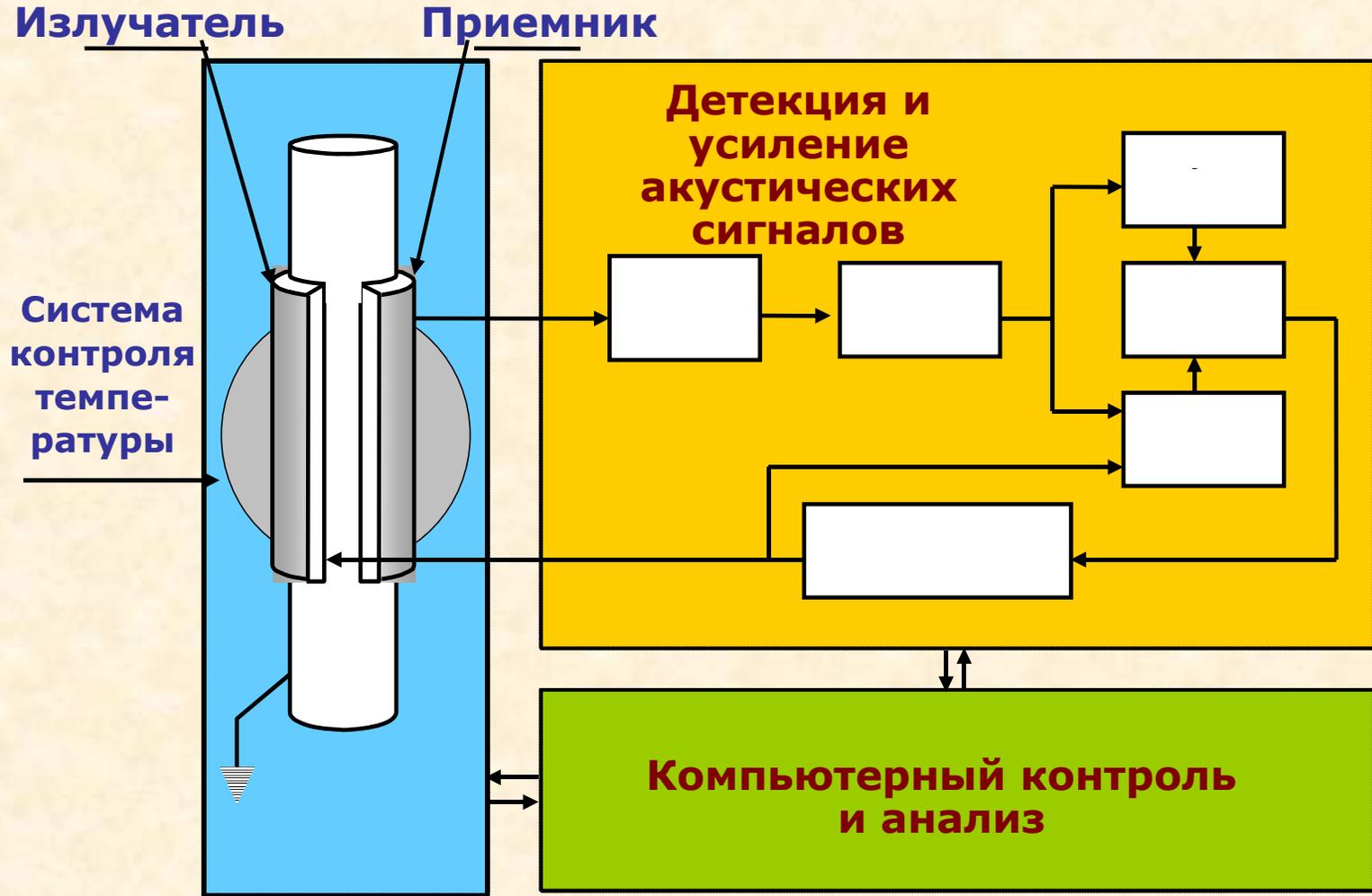


Настольный двухкамерный
анализатор

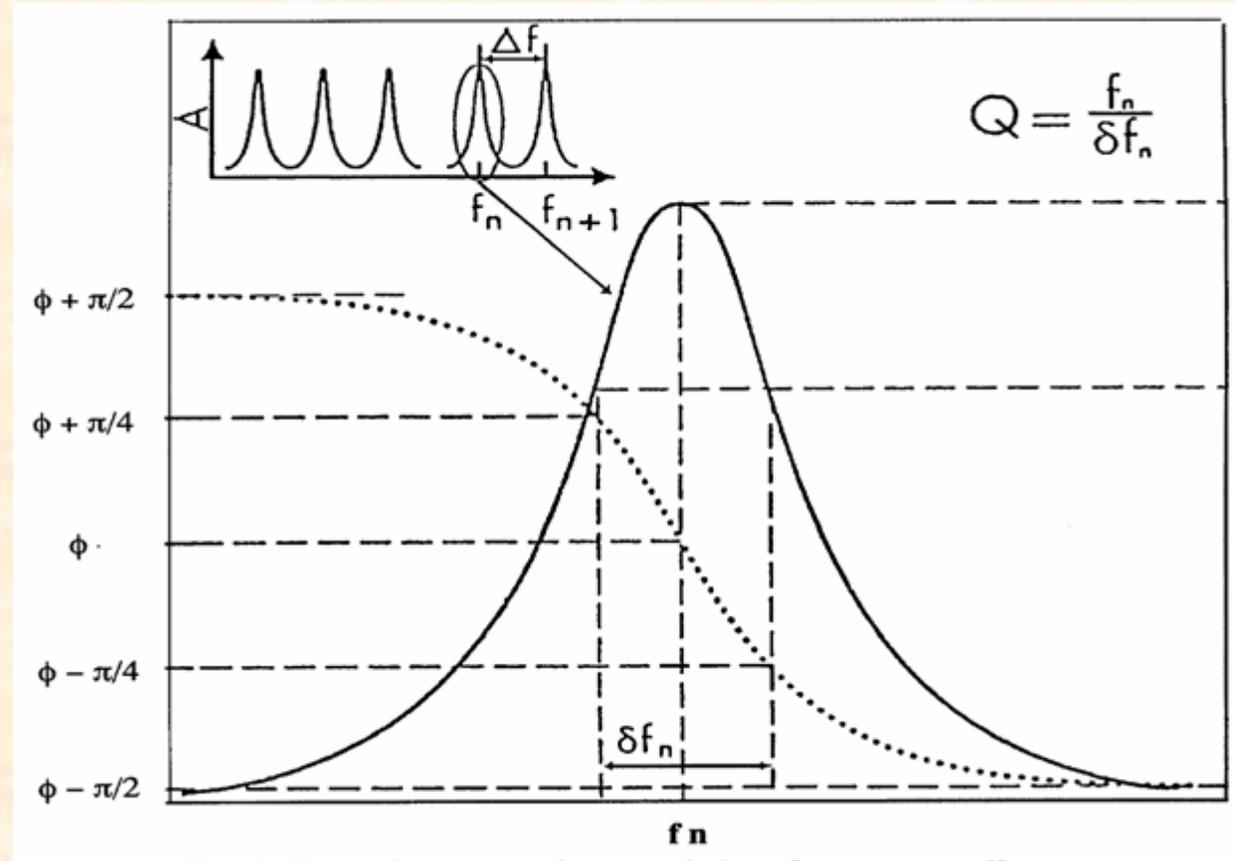
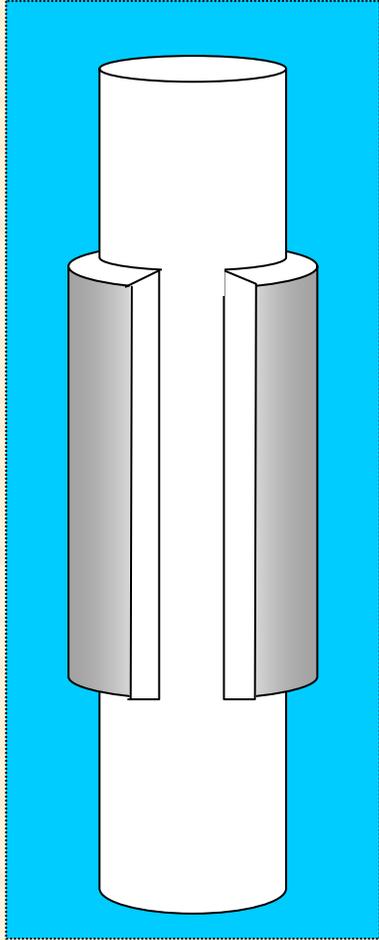


Выносной датчик для анализа проб

Блок-схема ультразвукового детектора



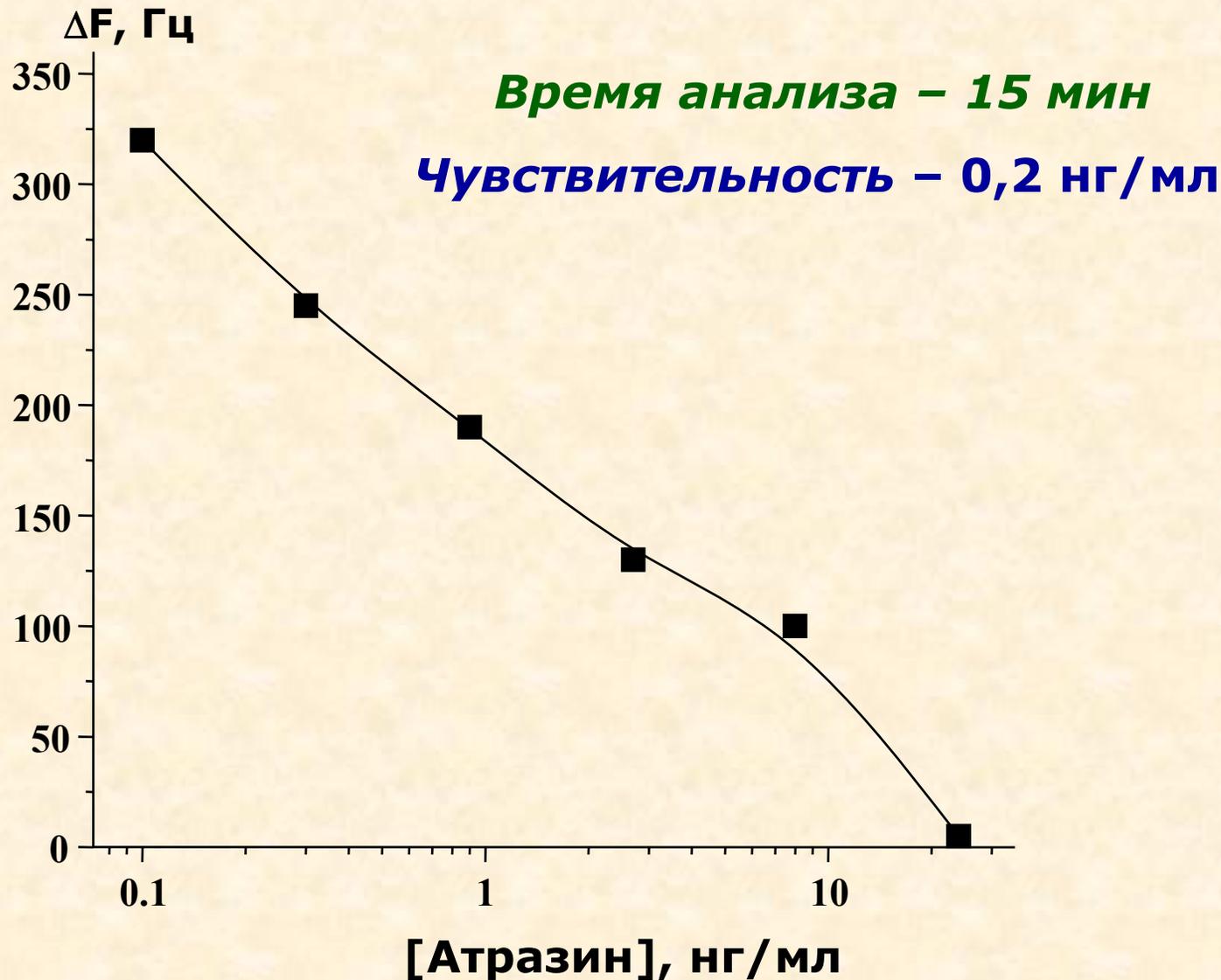
Основные акустометрические параметры



Частота (f_n) цилиндрических стоячих волн резонатора пропорциональна скорости распространения ультразвука

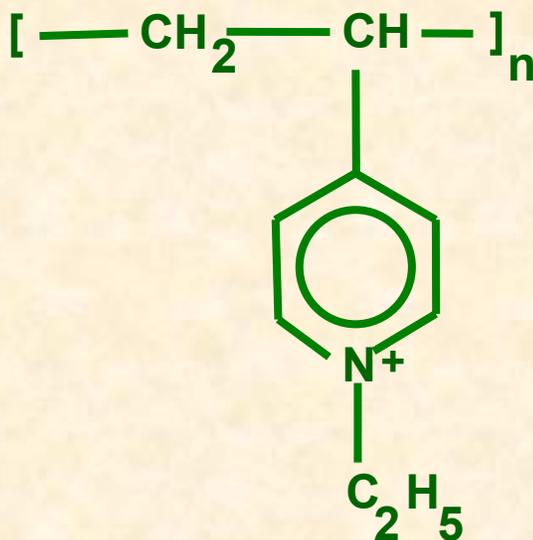
Полуширина резонансного пика (Δf_n) пропорциональна поглощению ультразвука

Гомогенный иммуноанализ атразина с акустической детекцией

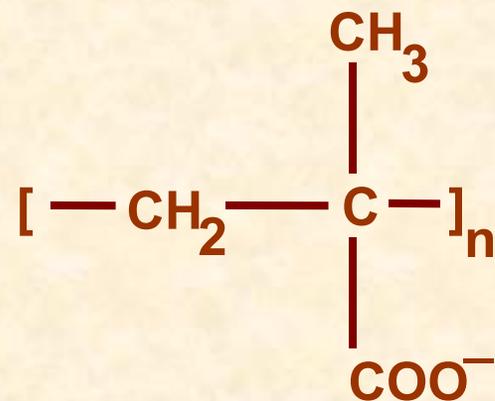


Анализ на основе водорастворимых полиэлектролитов

Полиэлектролитные носители для иммуноанализа

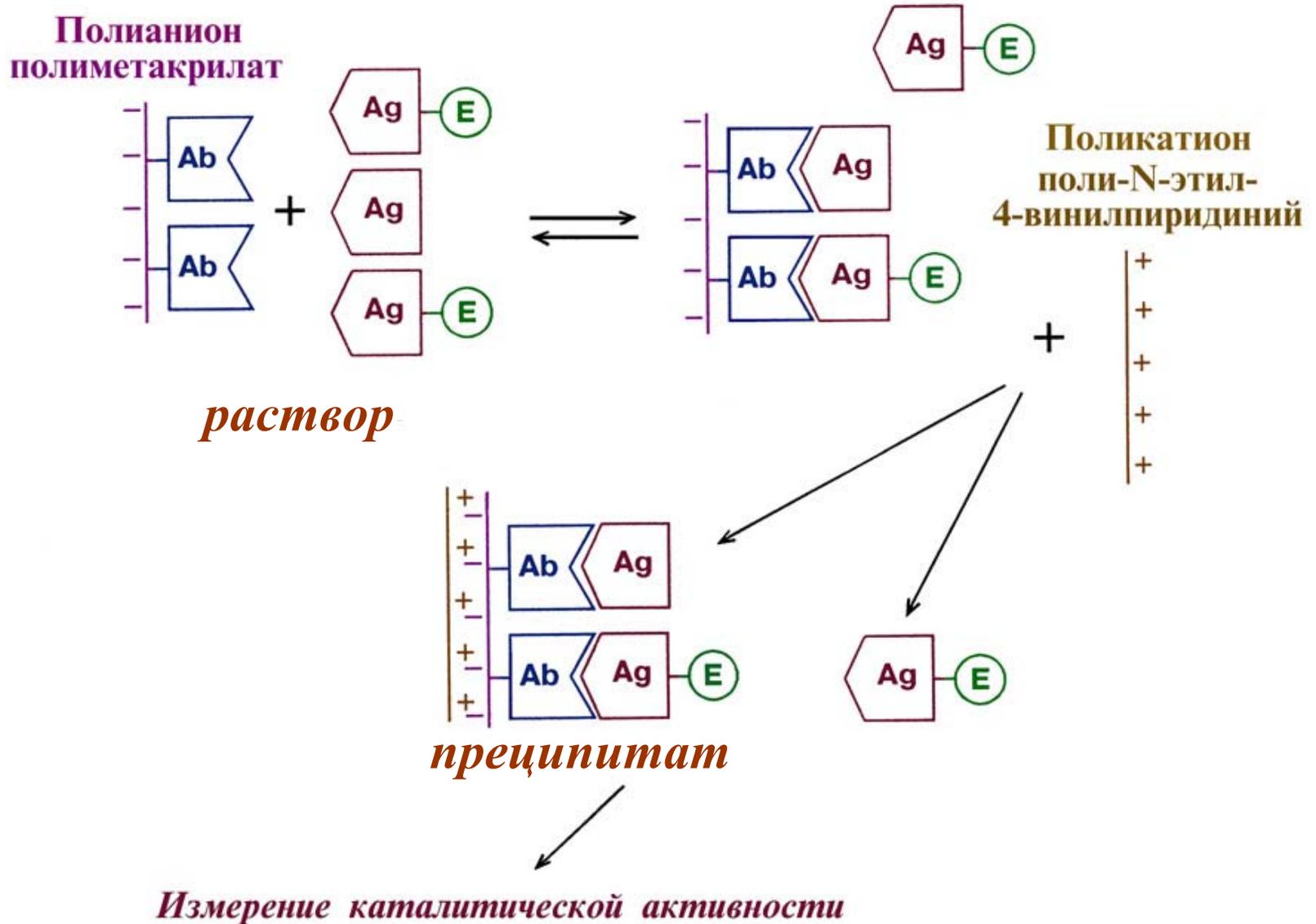


Поли-N-этил-4-винилпиридиний
(поликатион)
м.м. 1000-2000 кДа



Полиметакрилат
(полианион)
м.м. 260-380 кДа

Иммуноферментный анализ на основе водорастворимых полиэлектролитов



Определяемый антиген	Твердофазный ИФА		ИФА с полиэлектролитами	
	<i>Чувствительность, нг/мл</i>	<i>Длительность, ч</i>	<i>Чувствительность, нг/мл</i>	<i>Длительность, мин</i>
Тестостерон	0,1	3	0,1	40
Инсулин	4	3	8	15
IgG	10	2	10	10
Амилаза	1	2	5	30
HBs антиген	1	4	1	30

Преимущества полиэлектролитного иммуноанализа

- **Значительное сокращение времени анализа**
- **Чувствительность сопоставима с твердофазным ИФА**
- **Возможность детекции низко- и высокомолекулярных антигенов**
- **Низкий уровень неспецифических взаимодействий**
- **Возможность использования стандартного оборудования для ИФА**



Иммуносенсоры

Основные типы иммуносенсоров

Оптические

Потенциометрические

Амперометрические

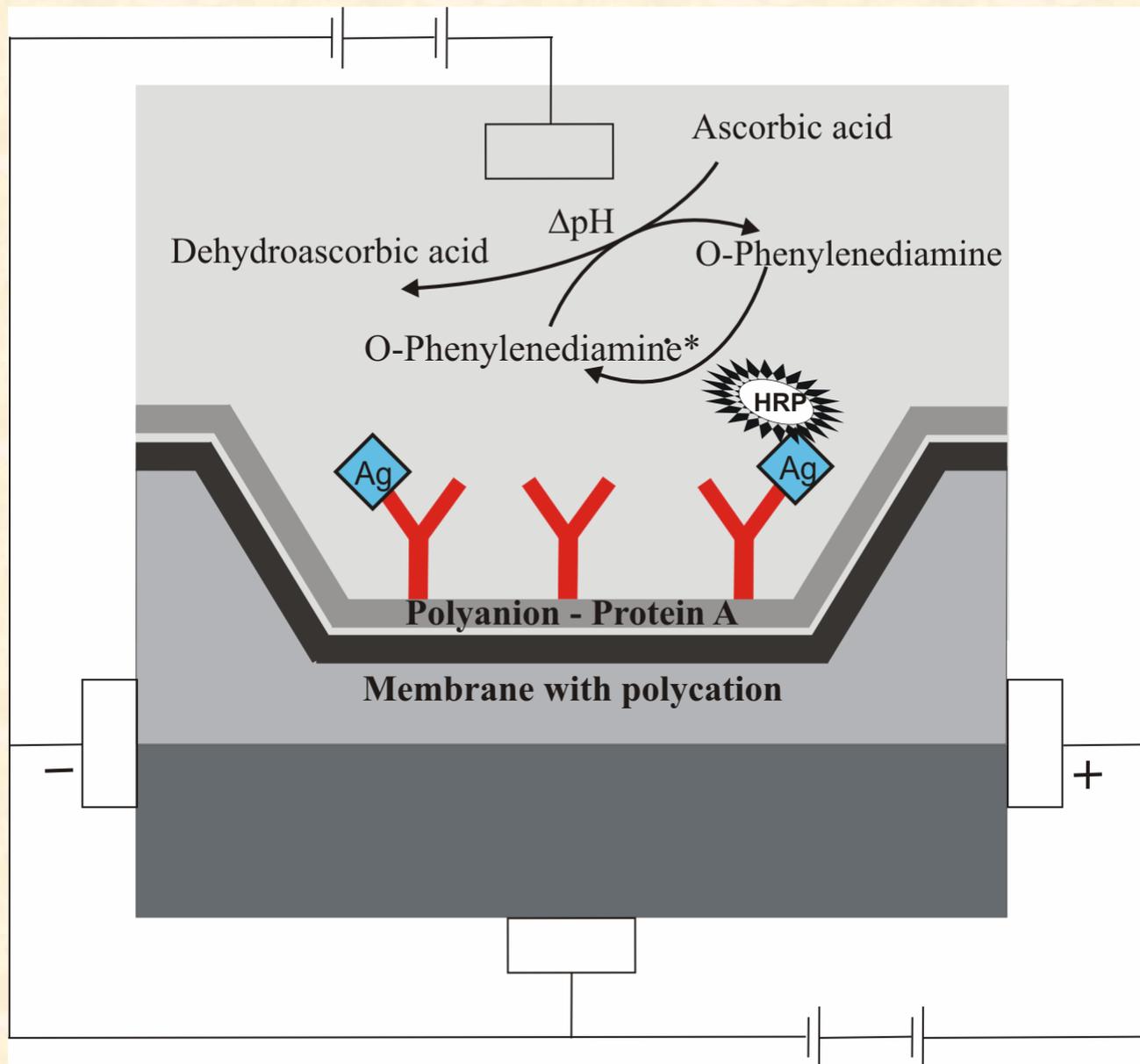
Кондуктометрические

Пьезоэлектрические

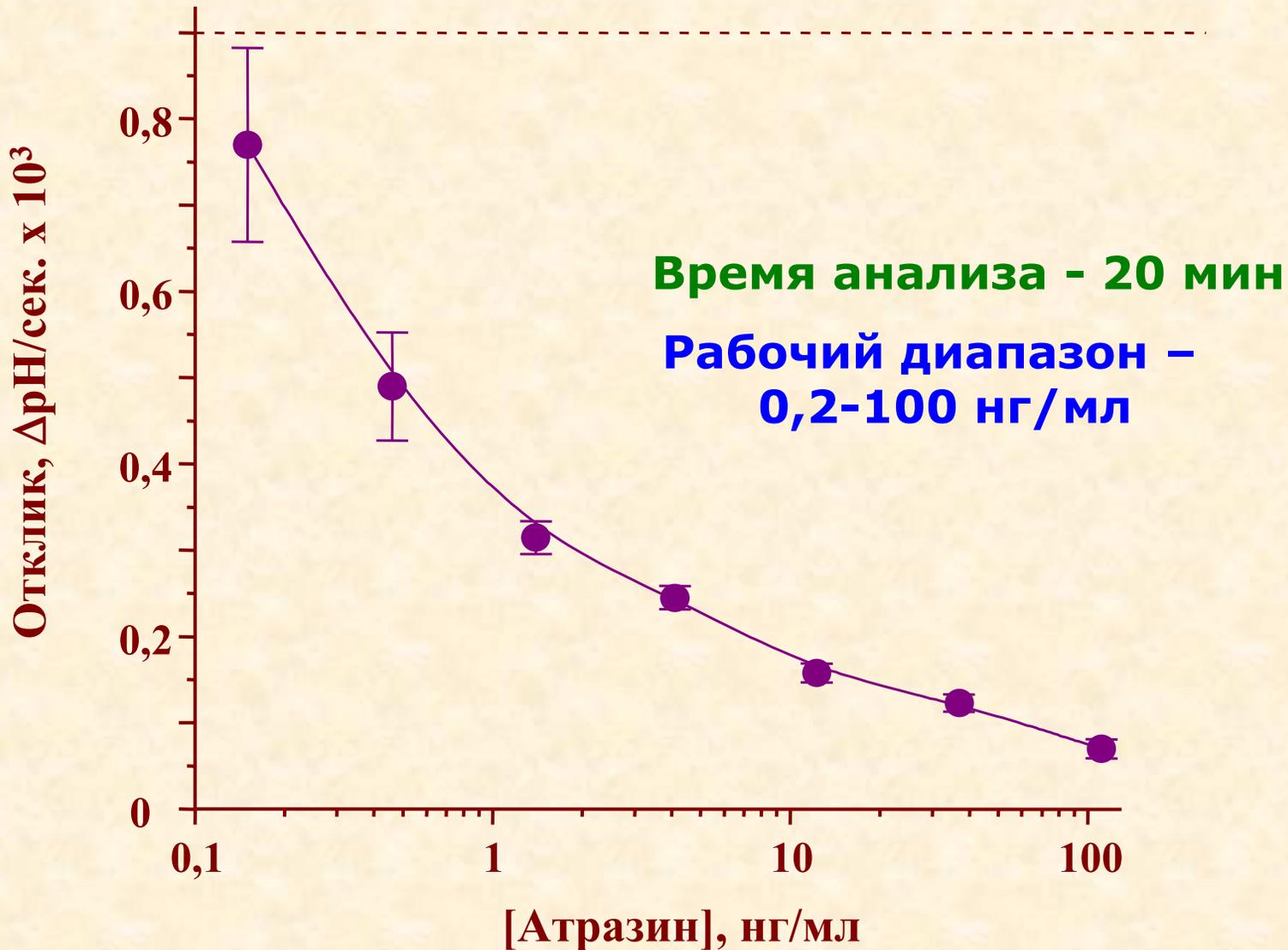
Термометрические

Акустические

Принцип электрохимического иммуноанализа с полиэлектrolитным разделением



Определение пестицида атразина с помощью иммуносенсора на основе полевого транзистора



Сравнение традиционного и полиэлектролитного иммуносенсорного определения атразина

МЕМБРАНА С АНТИТЕЛАМИ

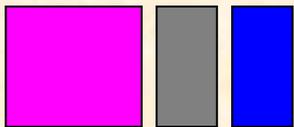


Чувствительность –
0,3 нг/мл

Гетерогенные иммунные реакции (~80 мин.)
Ферментативная реакция (~5 мин.)

Время анализа –
1,5 ч.

МЕМБРАНА С ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОМ

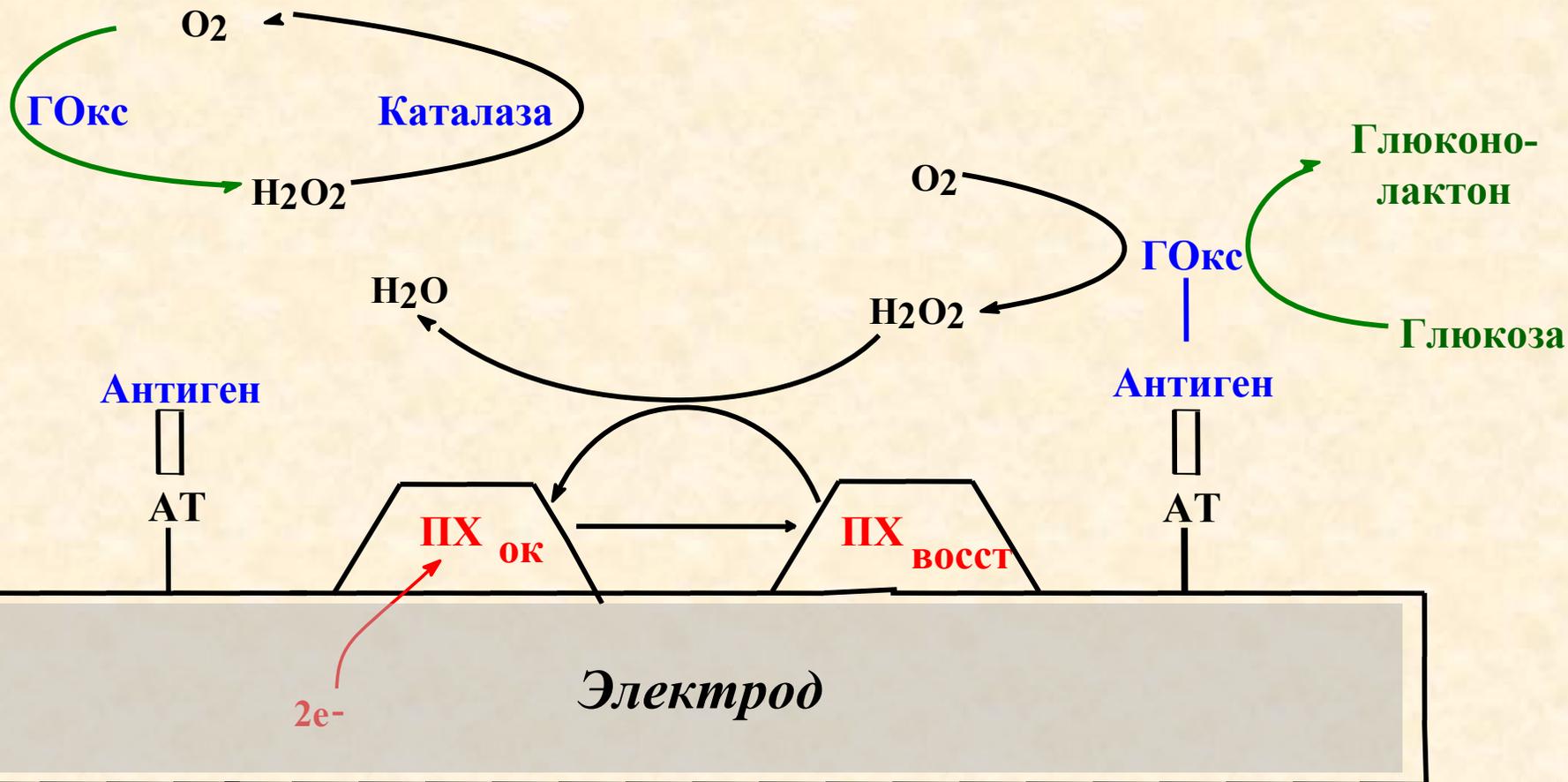


Чувствительность –
0,2 нг/мл

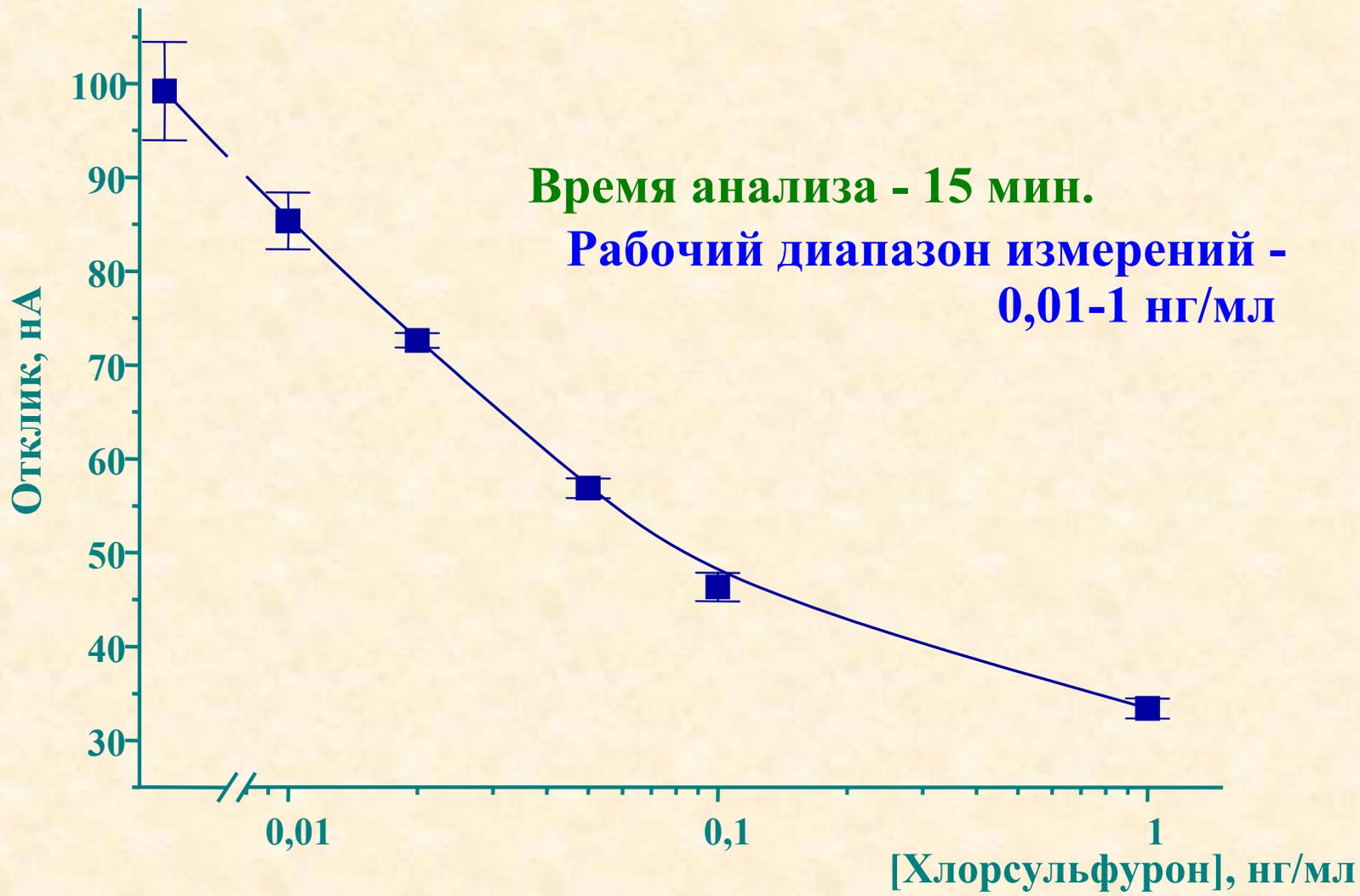
Гомогенные иммунные реакции (10 мин.)
Полиэлектролитное разделение (5 мин.)
Ферментативная реакция (~5 мин.)

Время анализа –
20 мин.

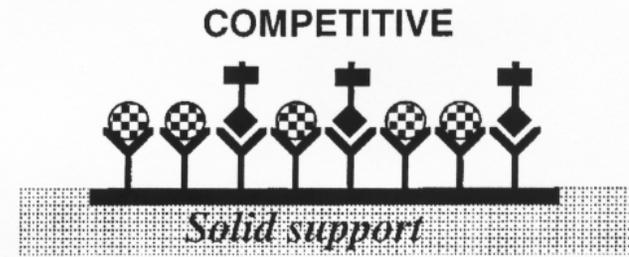
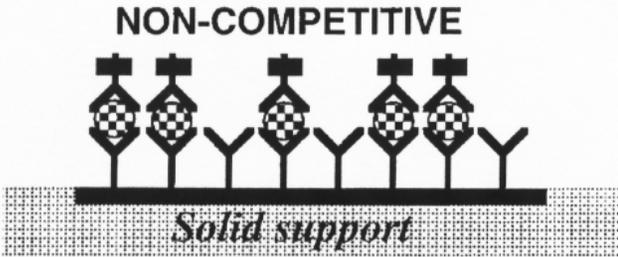
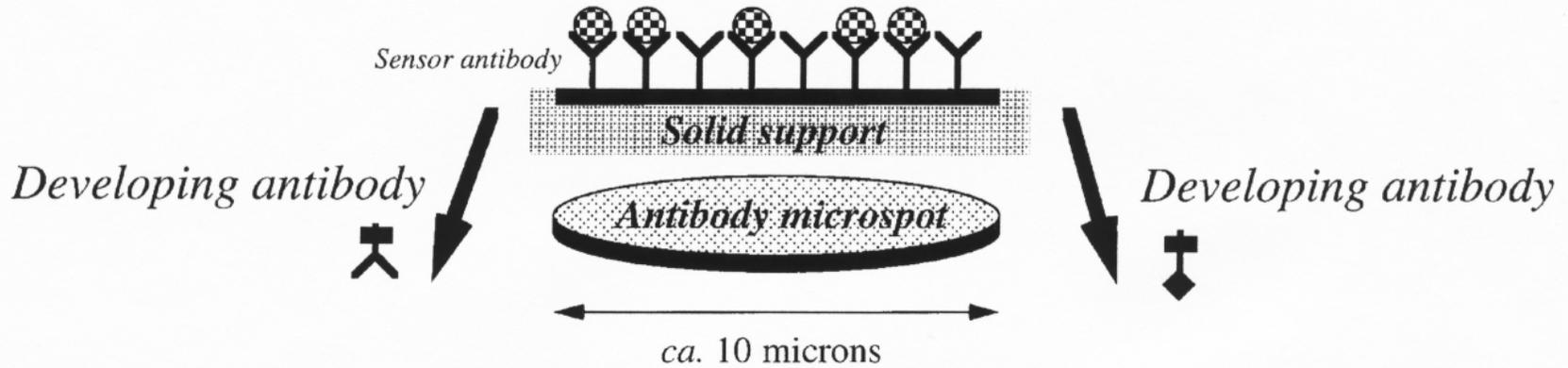
Биферментная система электрохимических измерений с использованием скрин-принт электродов



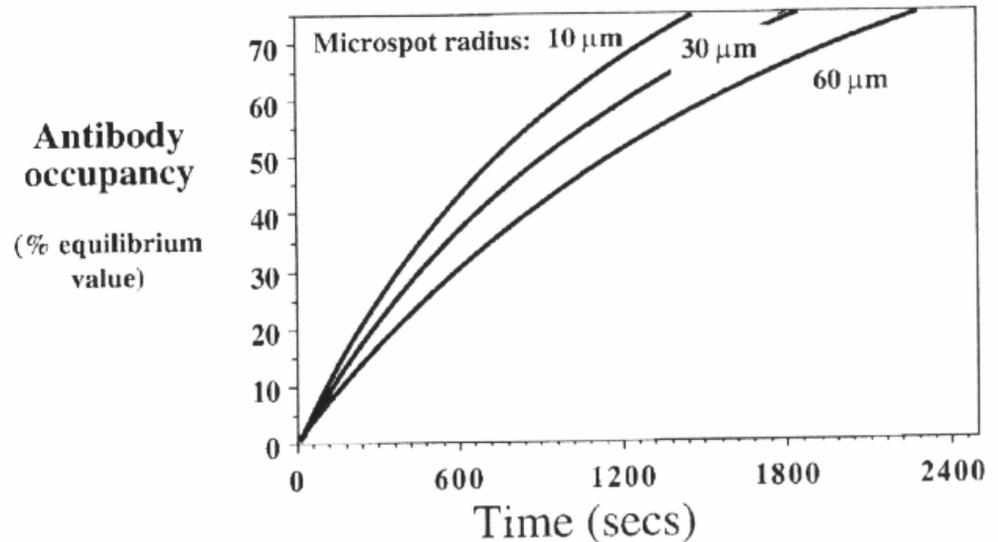
Определение гербицида хлорсульфурона с помощью иммуносенсора на основе скрин-принт электрода

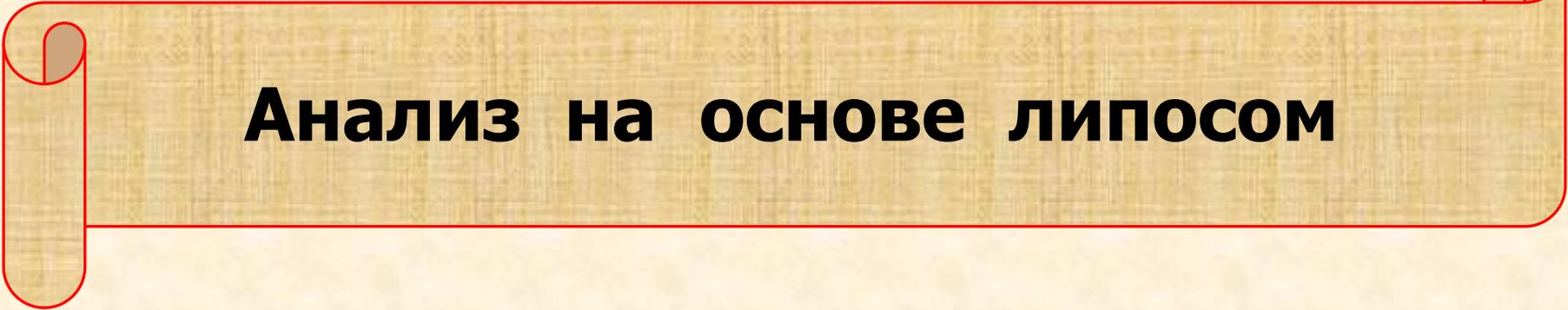


Формирование иммунокомплексов в микрочипах



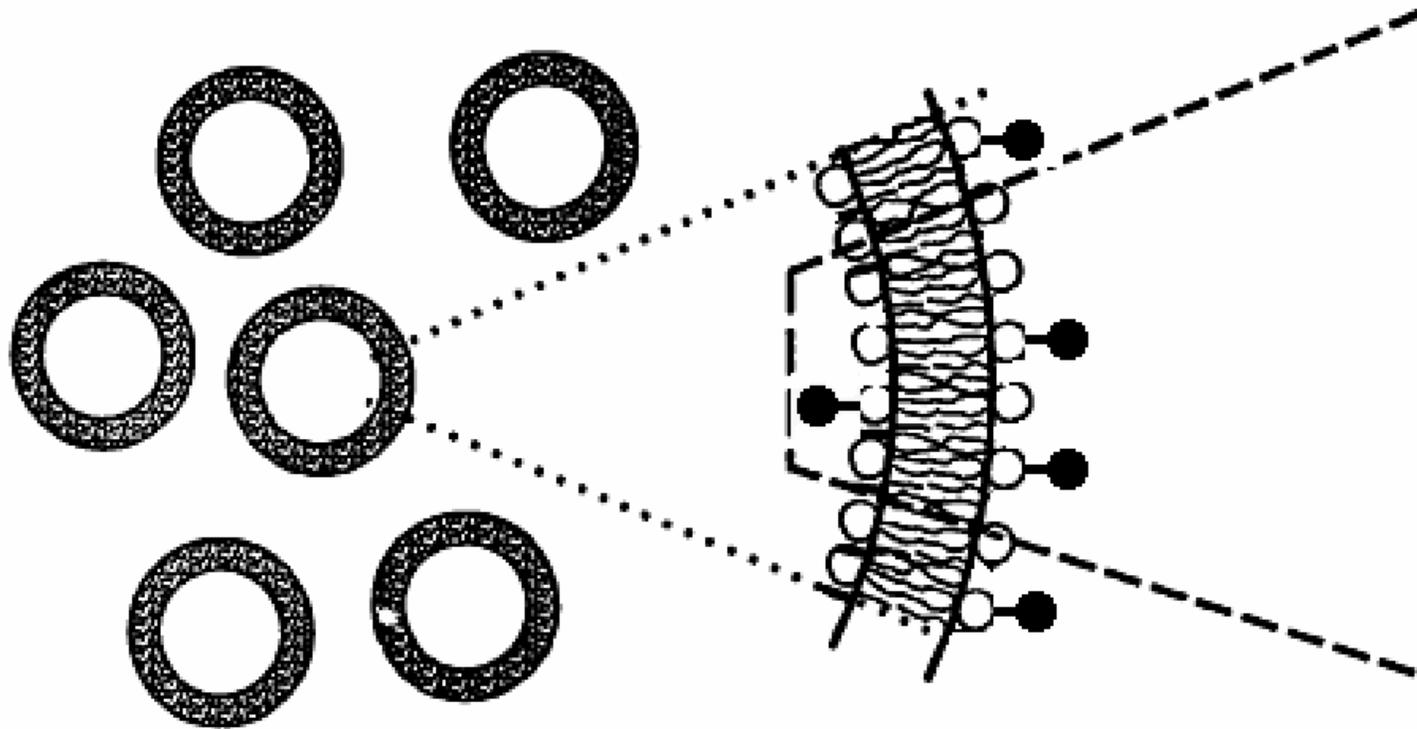
*Моделирование
кинетики реакции
антитело-антиген
на поверхности микрочипа*





Анализ на основе липосом

Структура липосом с встроенными антигенами



Липосомы

Липидный бислой

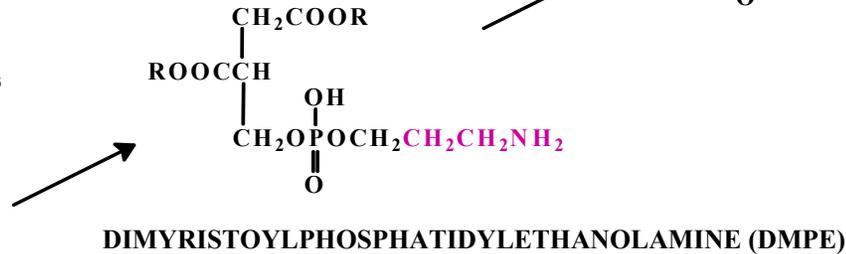
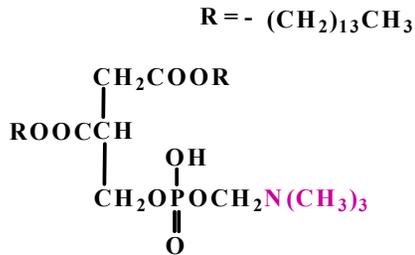
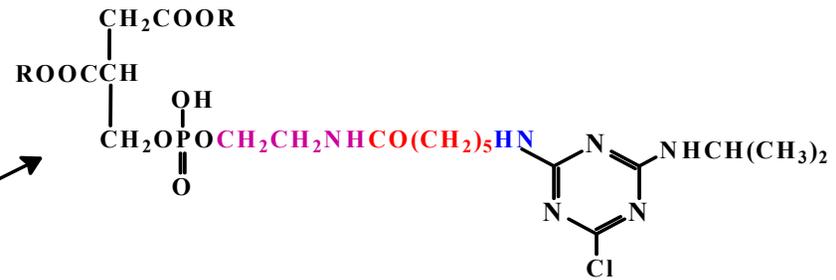
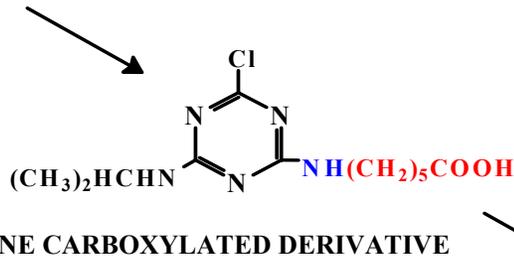
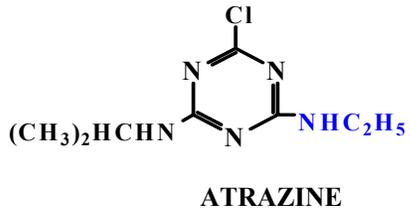


Фосфолипиды

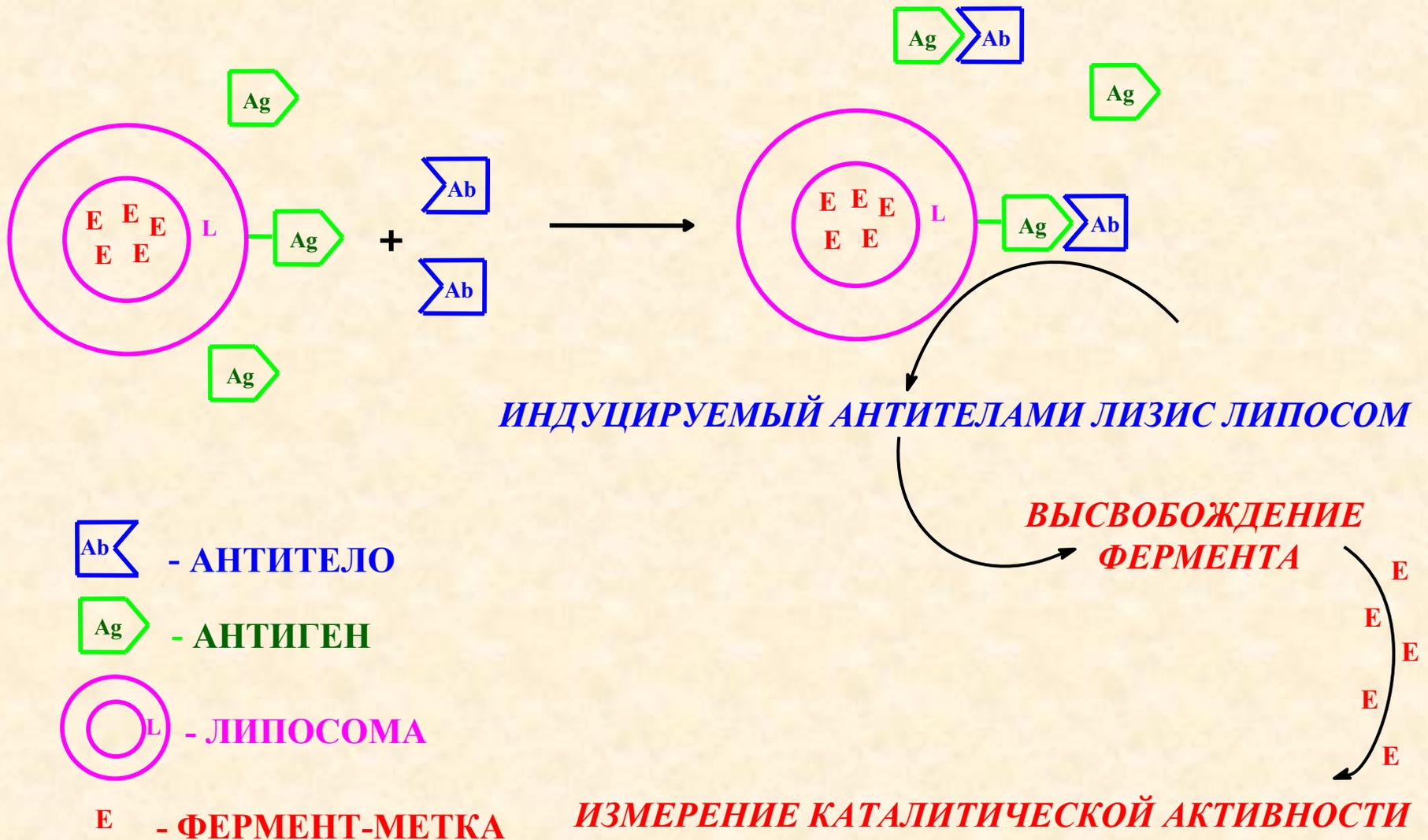


Конъюгат гаптен-липид

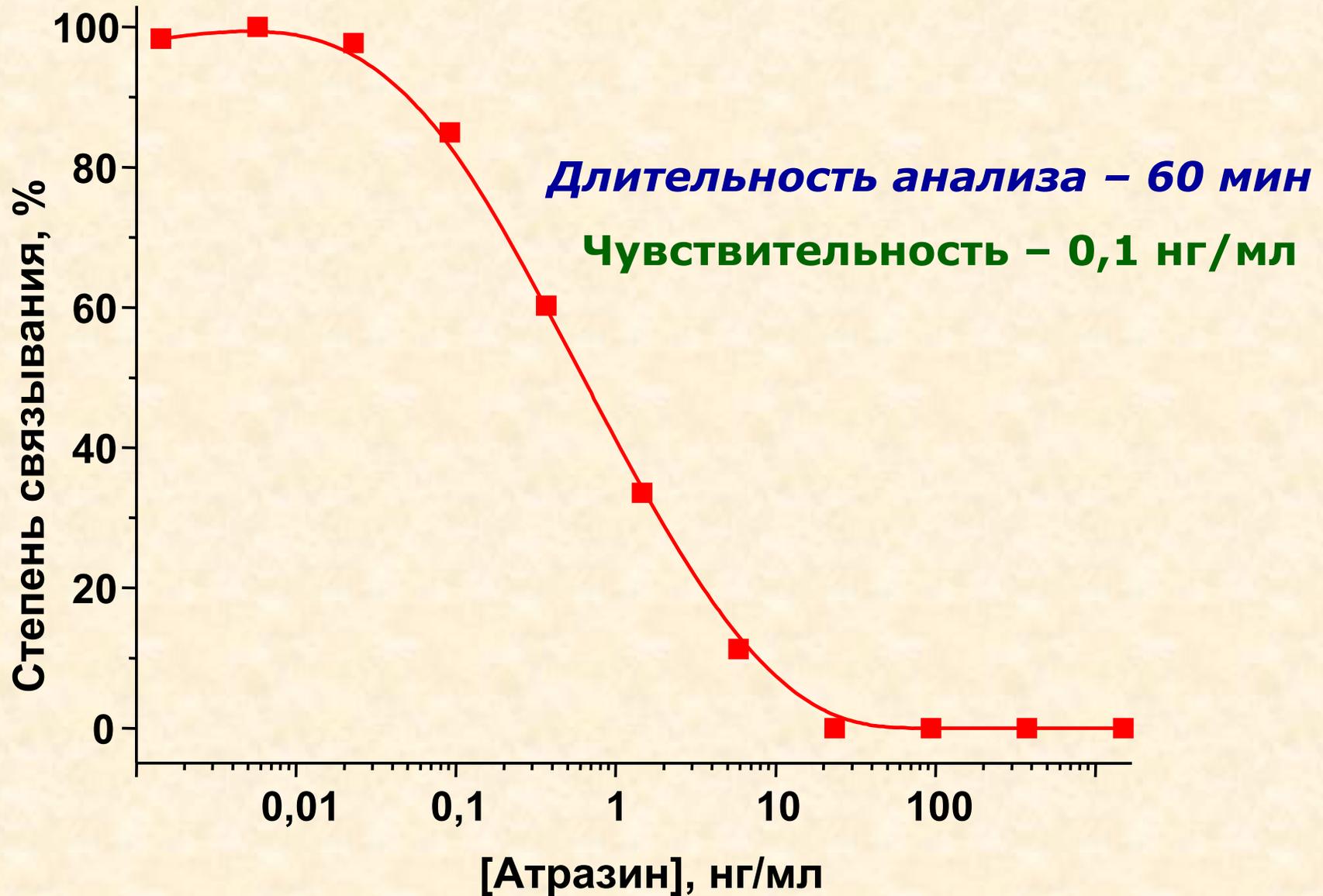
Получение конъюгата атразин-липид



Принцип липосомального иммуноферментного анализа



Иммунодетекция атразина методом липосомного иммуноанализа



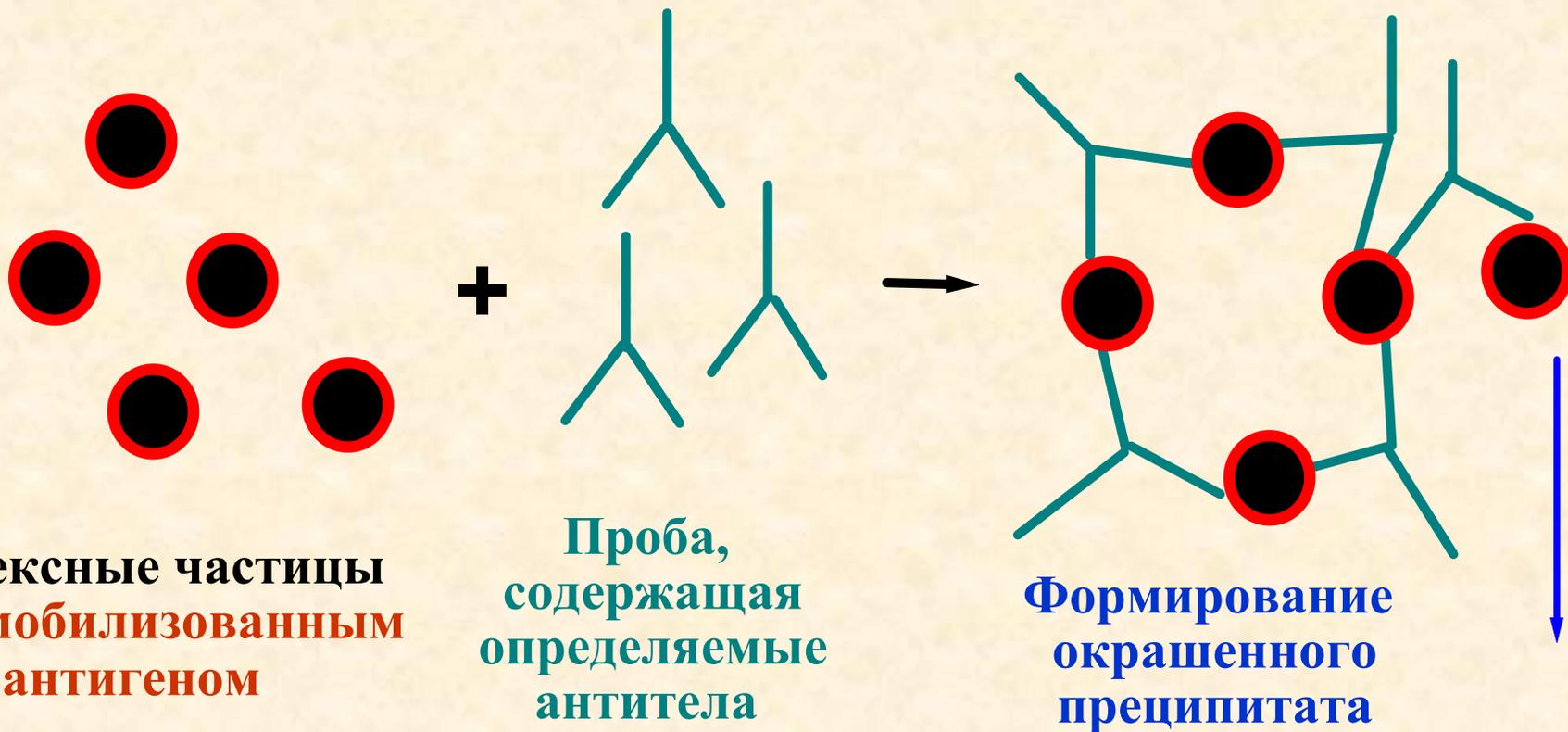
ВИЗУАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ЭКСПРЕСС-ИММУНОАНАЛИЗА

Латекс-агглютинация

Иммунофилтрация (дот-анализ)

Иммунохроматография

Принцип латекс-агглютинационного анализа



Достоинства метода:

- Однородность латексных частиц
- Возможность контролируемой нагрузки белка
- Применение цветных латексов

Латекс-агглютинационные системы иммунодетекции

Определение антител к микроорганизмам

Escherichia coli

Pseudomonas aeruginosa

Proteus mirabilis

Staphylococcus aureus

Klebsiella pneumoniae

Salmonella arizona

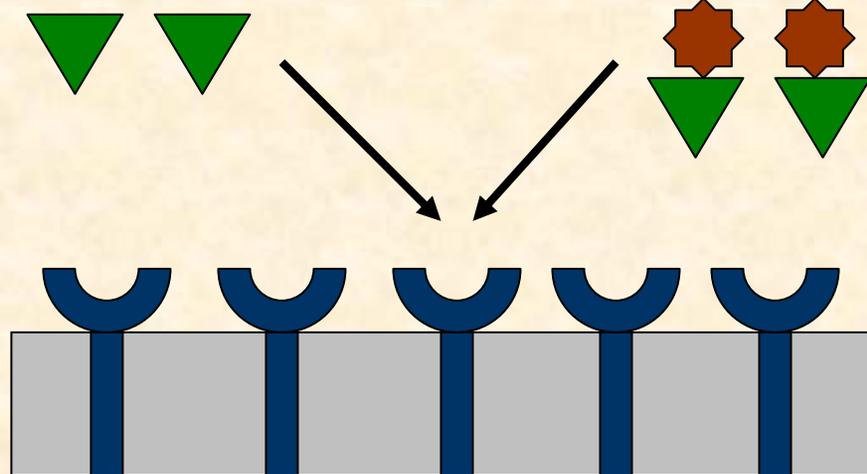
Salmonella minnesota

(Re-мутант)

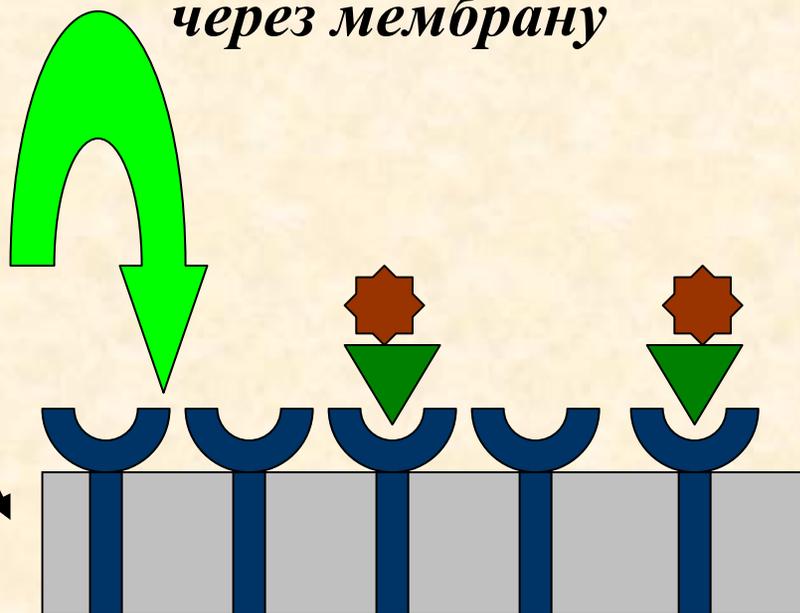
Принцип иммунофильтрационного анализа

Анализируемый
антиген

Меченый
антиген



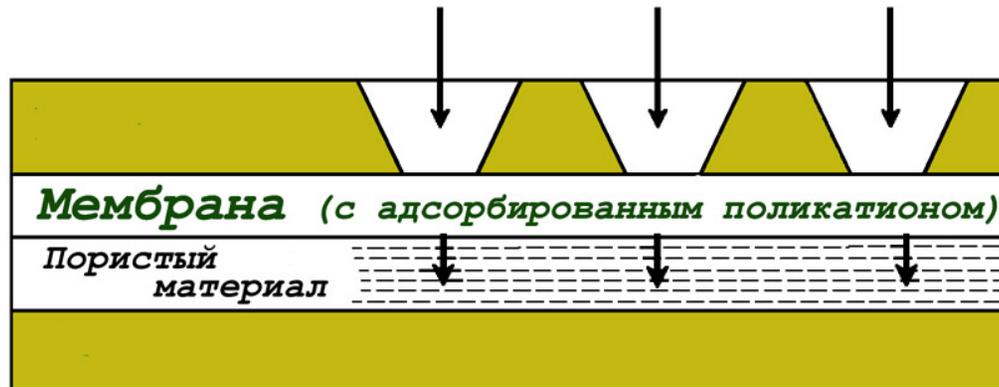
*Диффузия
через мембрану*



Мембрана
с иммобилизованными
антителами

Детекция метки
на мембране
после фильтрации

Принцип мембранного полиэлектролитного иммуноанализа



Добавление субстрата пероксидазы

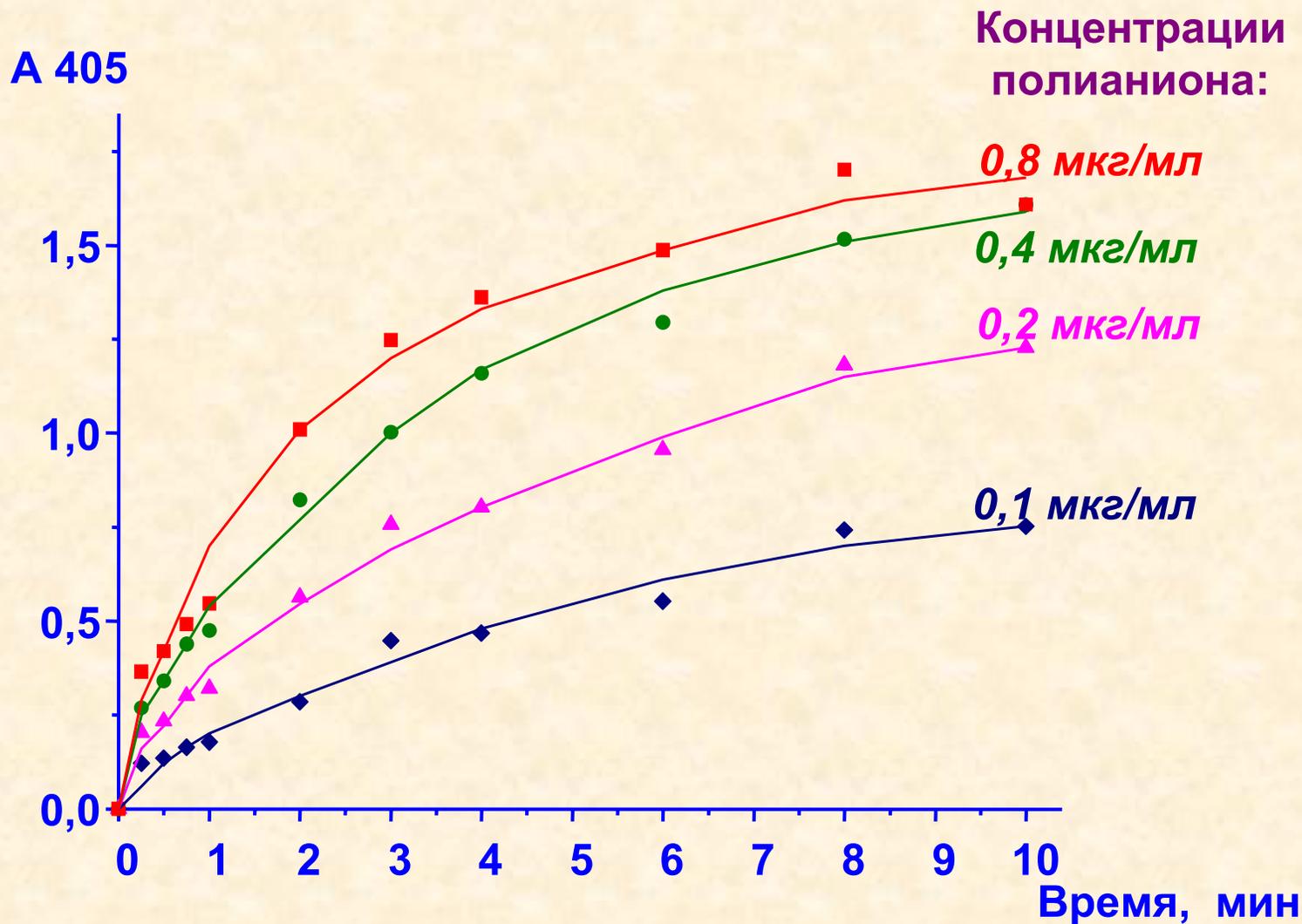


Определяемый антиген отсутствует



Наличие антигена в пробе

Кинетика гетерогенной интерполиэлектролитной реакции



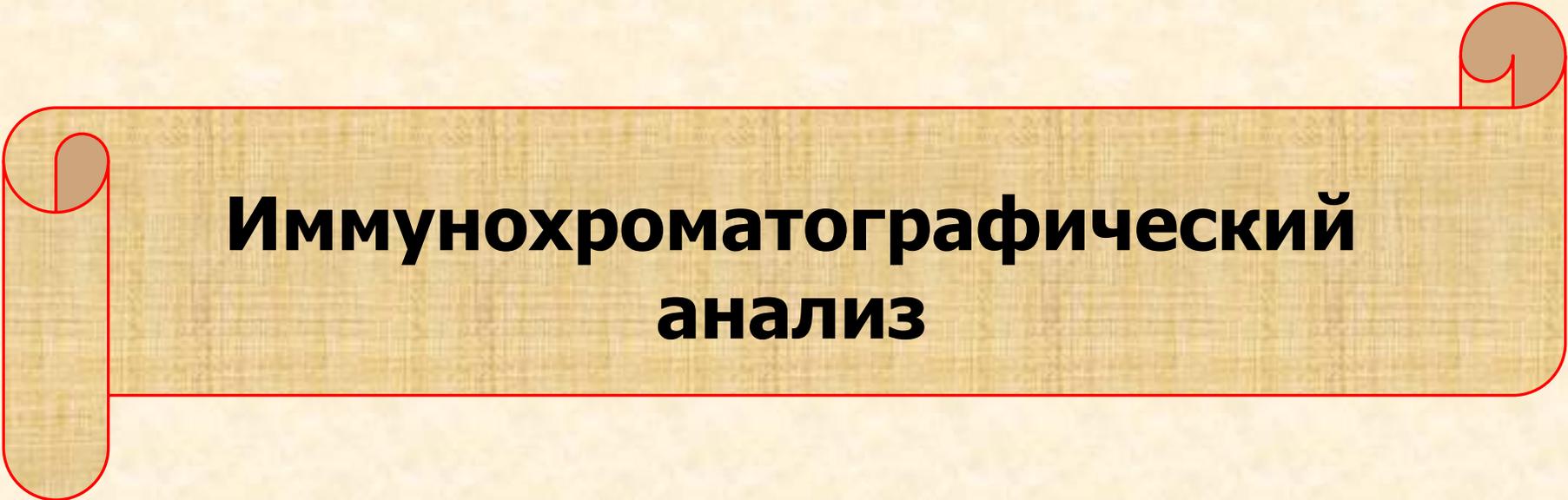
Иммунофилтрационный анализ тестостерона

Длительность анализа – 15 мин

Чувствительность – 0,1 нг/мл

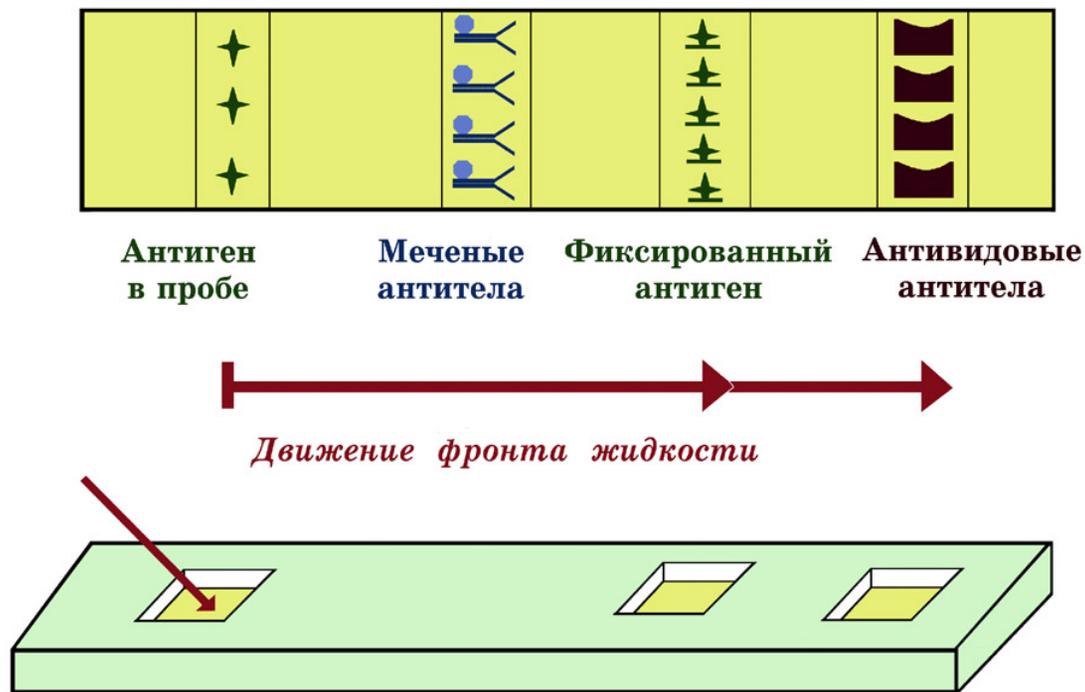
**Пороговый уровень
разделения положительных
и отрицательных проб – 1 нг/мл**



A decorative graphic of a scroll with a red border and a light brown textured interior. The scroll is unrolled in the center, with the top and bottom edges curling upwards. The text is centered within the unrolled portion.

Иммунохроматографический анализ

Принцип иммунохроматографического анализа



Наличие антигена



Отсутствие антигена



Требуется повторный анализ





**Индивидуальные тесты и мультитесты
(на 2, 3, 5 соединений)**

Кассетная и открытая упаковка

Основные направления иммунохроматографической диагностики

- **Возбудители инфекционных заболеваний
(туберкулез, гепатит, СПИД и др.)**
- **Белки-маркеры соматических заболеваний**
- **Хориогонадотропин**
- **Мониторинг лекарств**
- **Наркотики**

Современная номенклатура иммунохроматографических тестов

Инфекционные заболевания

Гепатиты В и С
ВИЧ-инфекция
Туберкулез
Сифилиз
Хламидиоз
Инфекционный
 мононуклеоз
Малярия
Аденовирусная
 инфекция
Ротавирусная
 инфекция
Стрептококковые
 инфекции

Онкомаркеры

Специфический антиген простаты
Альфа-фетопротейн
Раковый эмбриональный антиген

Кардиомаркеры

МВ-фракция креатинкиназы
Миоглобин
Тропонин I

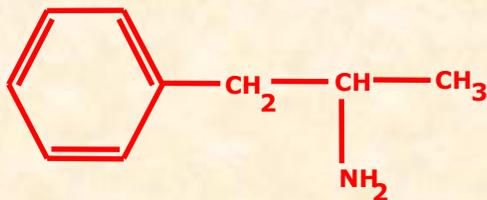
Гормональный статус

Лютеинизирующий гормон
Тиреотропный гормон
Фолликулостимулирующий гормон
Пролактин

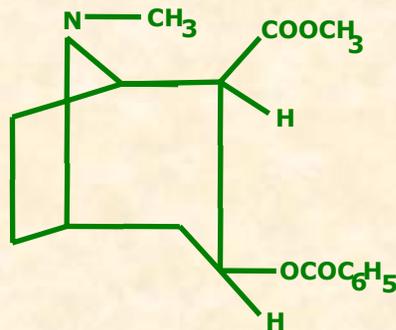
Основные определяемые наркотики

- **Опиаты**
 - **Каннабиноиды**
 - **Амфетамин**
 - **Метамфетамин**
 - **Бензодиазепины**
 - **Кокаин**
 - **Фенциклидин**
 - **Барбитураты**
 - **Метадон**

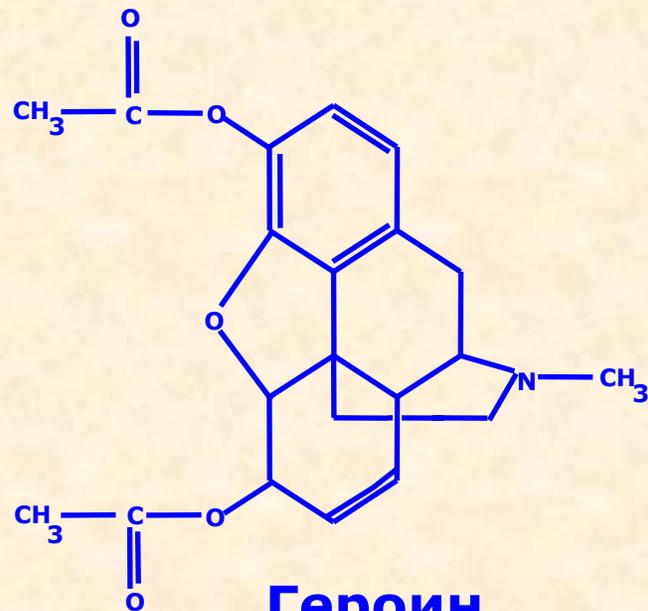
Структурные формулы наркотических соединений и их метаболитов



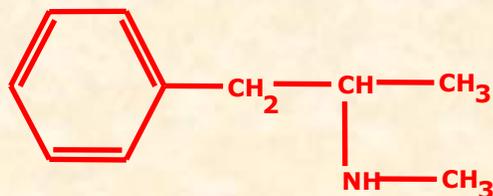
Амфетамин



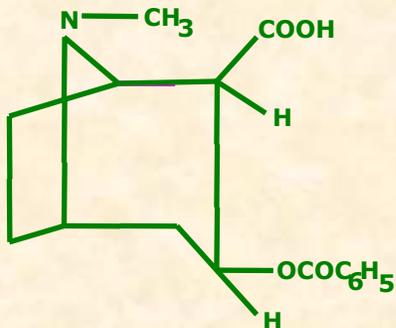
Кокаин



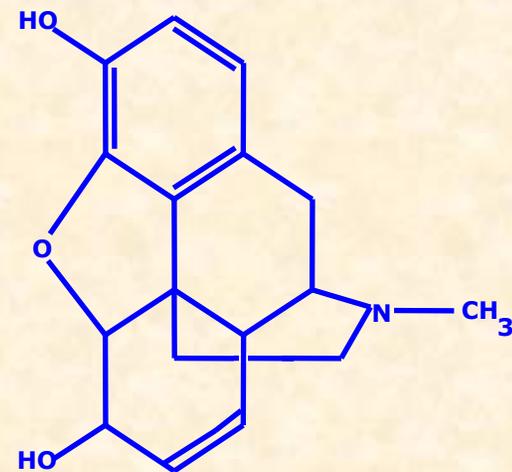
Героин



Метамфетамин



Бензоилэкгонин

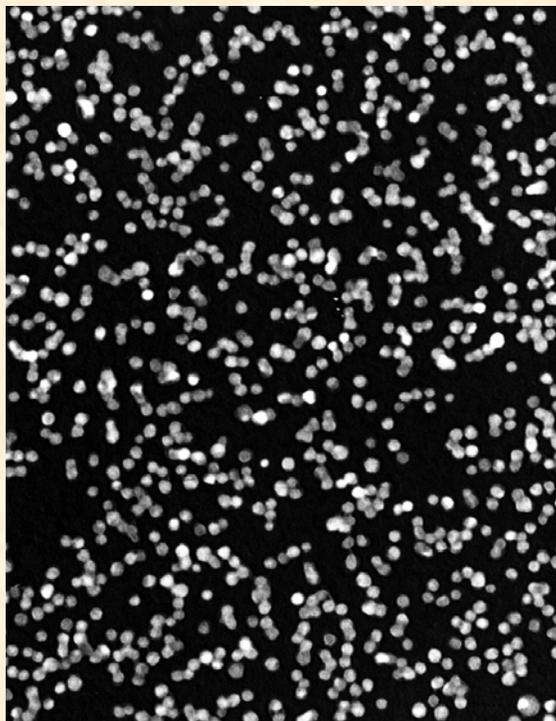


Морфин

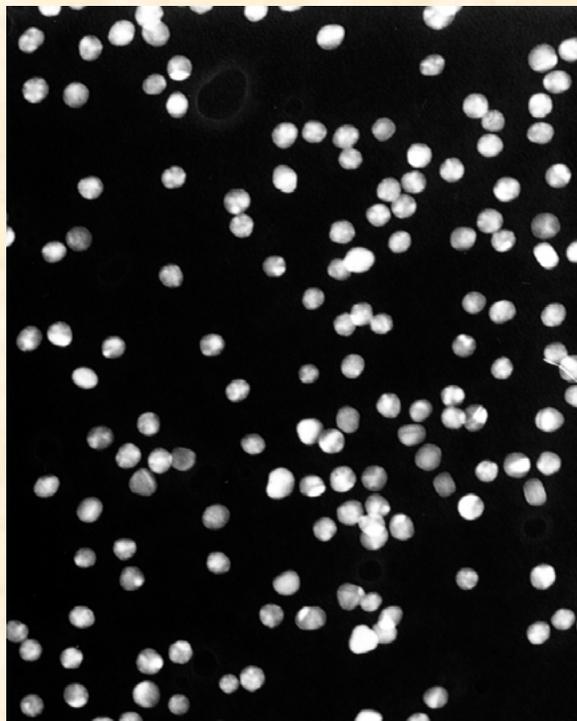
Для создания иммунохроматографических тестов необходимо:

- Получить специфические моноклональные антитела и их конъюгаты с маркерами (коллоидное золото, цветные латексы)**
- Изучить диффузионно контролируруемую реакцию антиген-антитело в слое пористого носителя и оптимизировать режим ее проведения**
- Отработать технологию нанесения иммунореагентов на мембранные носители**
- Определить условия, обеспечивающие сохранение рабочих характеристик тест-систем в течение длительного времени**

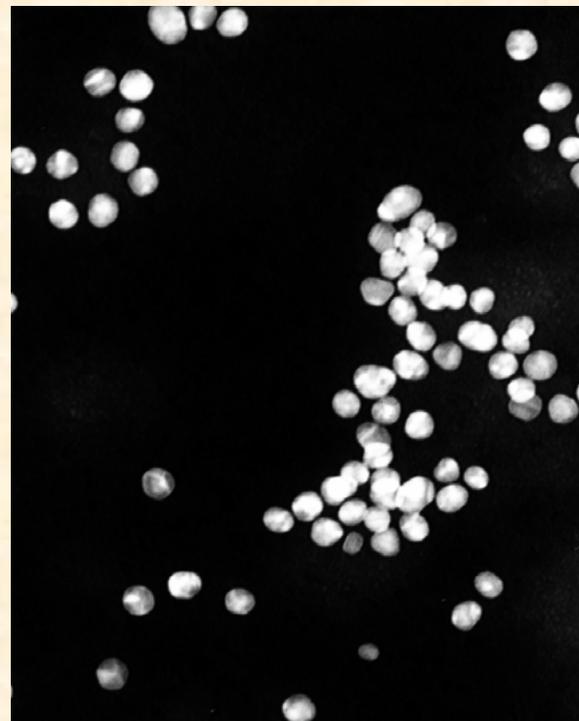
Получение коллоидного золота и выбор оптимального диаметра частиц



5 нм



15 нм



30 нм

Средний диаметр частиц

Сорбционная емкость

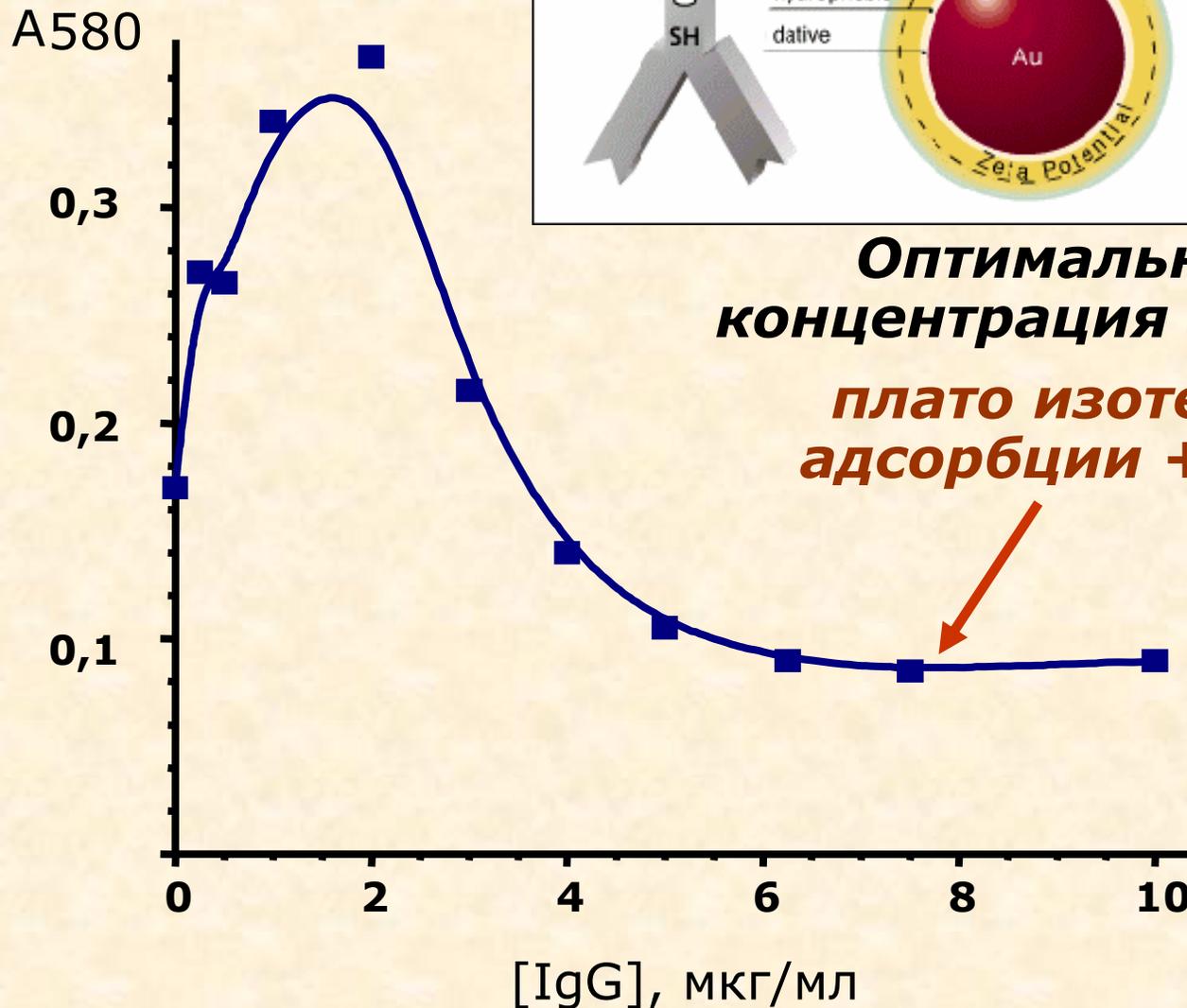
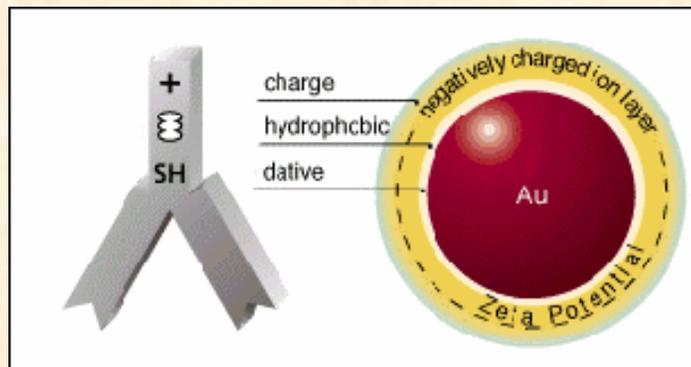
(количество молекул антител на одну частицу)

2:1

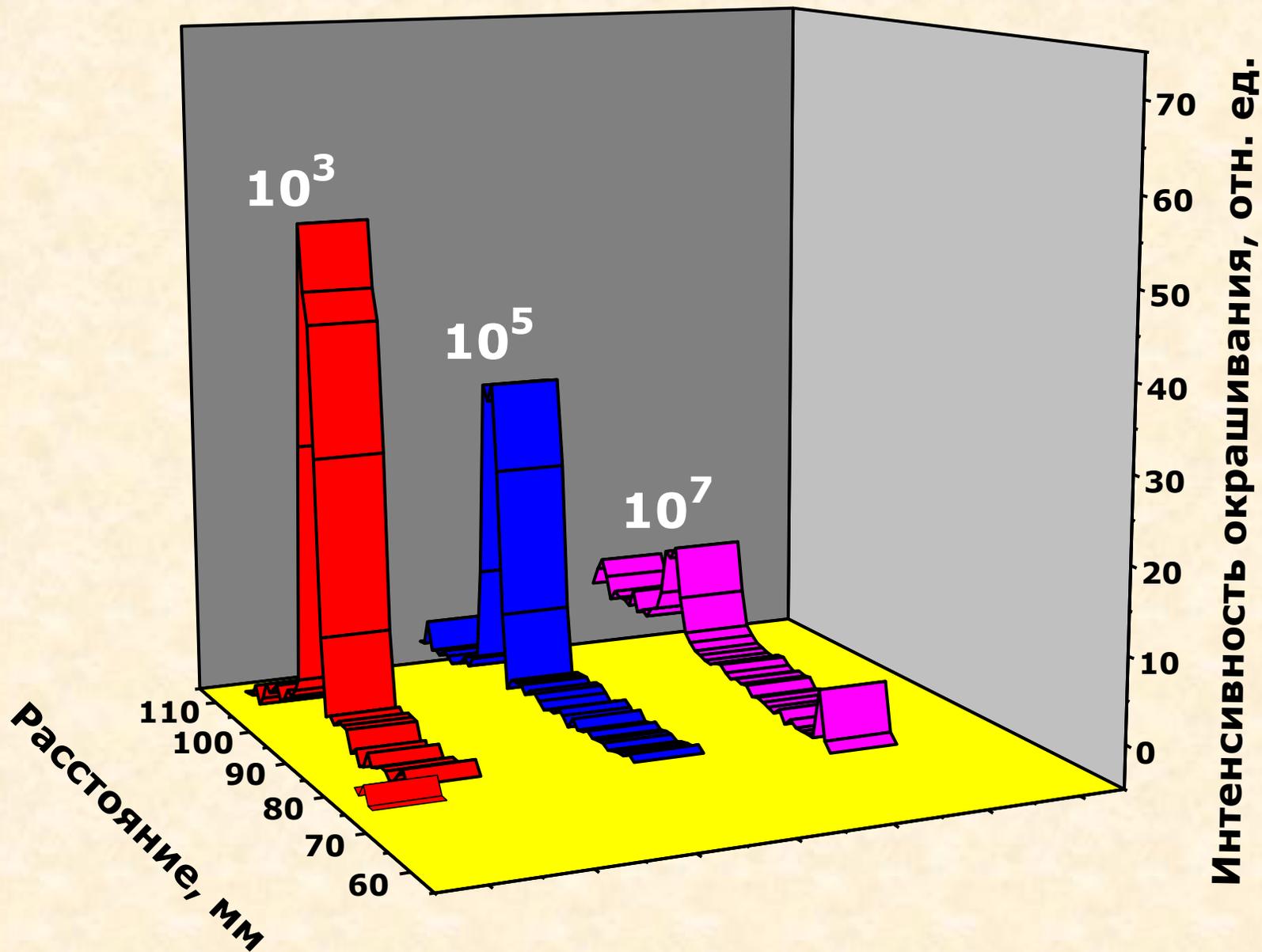
16:1

63:1

Монослойная иммобилизация антител на частицах коллоидного золота



Иммунохроматографическое определение клеток *Legionella pneumophila*



Диагностика микроальбуминурии

**Содержание сывороточного альбумина в моче в концентрациях:
до 30 мкг/мл – норма.**

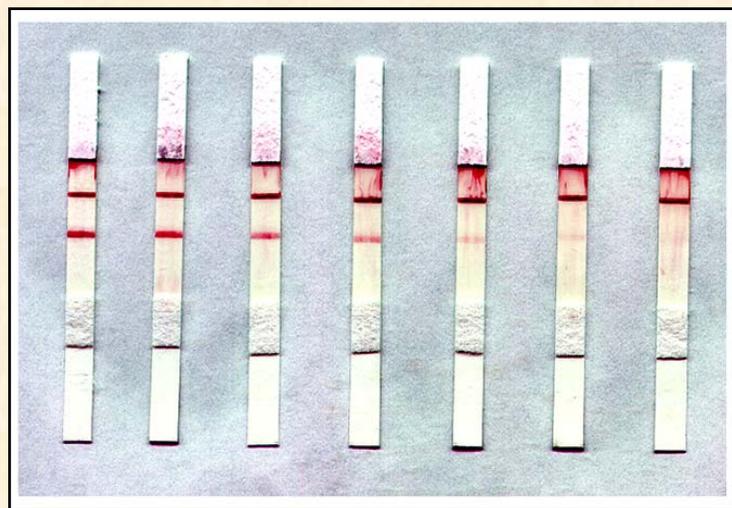
**от 30 до 300 мкг/мл (микроальбуминурия) –
патология клубочкового аппарата почек
(в т.ч. при сахарном диабете, гипертонической болезни и др.)**

***Микроальбуминурия позволяет определять
доклинические стадии диабетической нефропатии и
является инструментом мониторинга состояния больных
диабетом I и II типов***

Макроальбуминурия – более 300 мкг альбумина на мл мочи

Иммунохроматографическое определение альбумина в моче

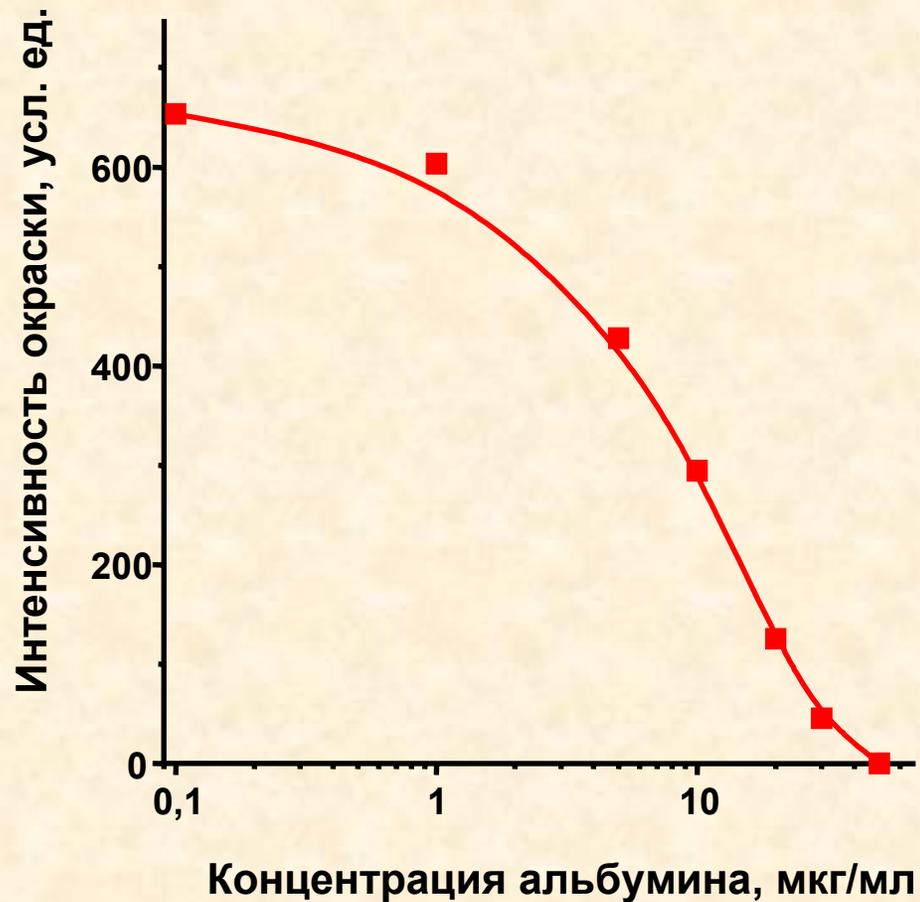
**Внешний вид
тест-полосок при разных
концентрациях антигена**

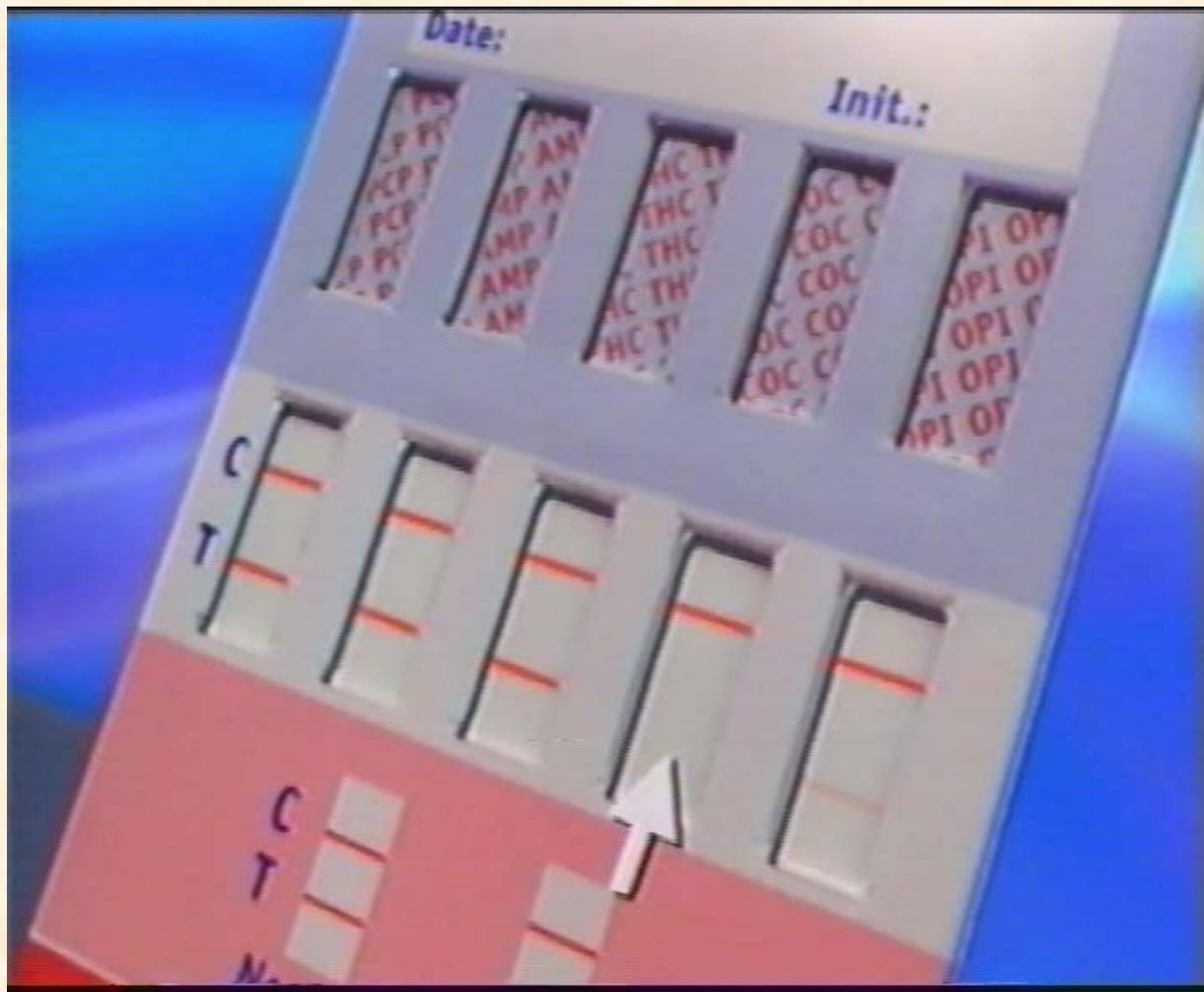


0 1 5 10 20 30 50

Концентрация альбумина
в пробе, мкг/мл

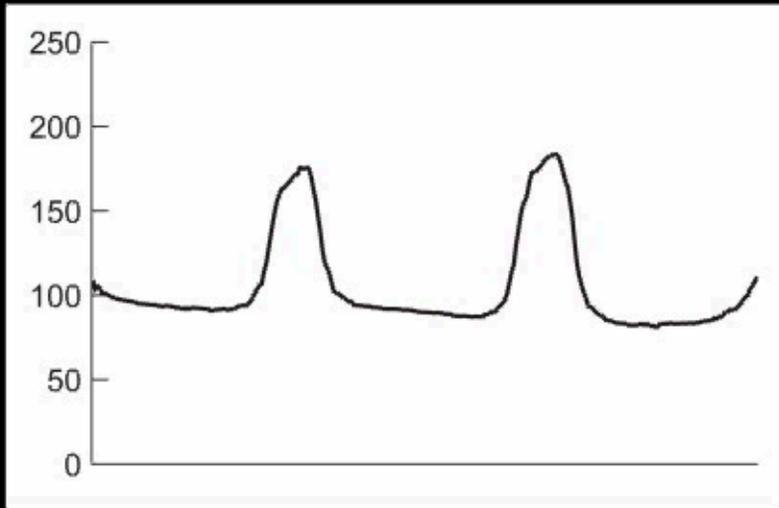
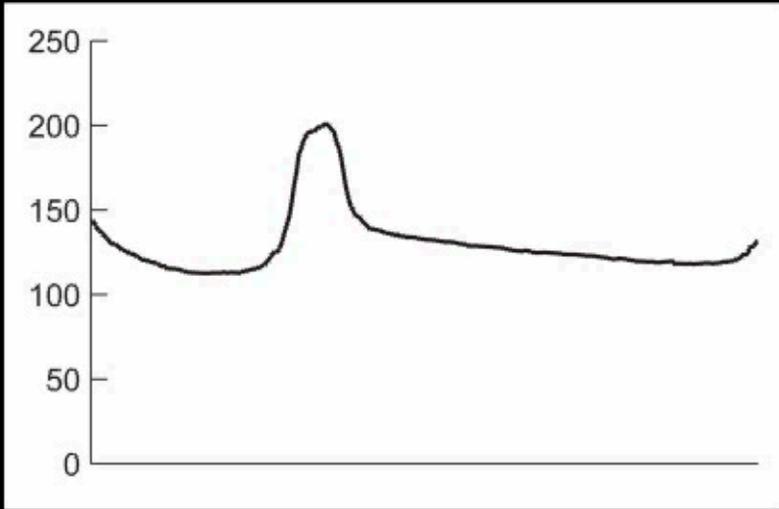
**Калибровочная кривая анализа
с фотометрической детекцией**





Результаты тестирования:

**положительные по кокаину
и отрицательные по другим наркотикам**



Портативный фотометр «Рефлеком» для мембранного иммуноанализа



- ✓ **Измерение распределения окраски и суммарной яркости зон**
- ✓ **Качественный и количественный анализ**
- ✓ **Возможность работы с разными видами тест-полосок**
- ✓ **Компьютерный вывод и управление процессом измерений**
- ✓ **Формирование архива данных о результатах анализов**

Программа для анализа иммунохроматограмм

Сохранение информации о тестируемой пробе

Профиль распределения окраски на мембране

Изображение тест-полоски

Видеотест

Файл | Анализы | Демка | Помощь

TNC

МАРИХУАНА

Пациент:

Ф.И.О.	Соколов В.С.	Диагноз	
Год р.	1975	пол	M
Мед. карта №	43675	Дата взятия материала	01.03.2001
Полис мед. страхования		Врач	Петров П.П.
Серия	II-СБ	№	345577
Страх. компания	РОСНО	Регистр. №	654
		Число	30.03.2001
		Результат анализа	Отрицательный

	Зона 1	Зона 2
	Тест	Контр
Интенсивность	7.4	7.7
Порог. значение	1.0	1.0
Концентрация		
Оценка теста	Отриц.	Годеп

Вычисление интенсивности полос

Вывод о результатах тестирования

ПРЕИМУЩЕСТВА ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ТЕСТОВ

- **Быстрые**
 - **Точные**
 - **Доступные по цене**
 - **Стабильные при хранении**
 - **Не требуют дополнительной аппаратуры и навыков**

Мировые объемы продаж point-of-care тестов

Объекты	2000		2005		Прирост в год, %
	Продажи, млн. долл.	Доля рынка, %	Продажи, млн. долл.	Доля рынка, %	
Профессиональное использование					
Глюкоза	625	26	800	22	6
<i>Хориогонадотропин</i>	<i>500</i>	<i>20</i>	<i>700</i>	<i>19</i>	<i>8</i>
<i>Инфекционные заболевания</i>	<i>335</i>	<i>14</i>	<i>425</i>	<i>12</i>	<i>5</i>
Критические состояния	275	11	375	10	7
Холестерин	250	10	400	11	12
Параметры свертывания крови	150	6	275	7	17
<i>Кардиомаркеры</i>	<i>50</i>	<i>2</i>	<i>100</i>	<i>3</i>	<i>20</i>
<i>Наркотики</i>	<i>50</i>	<i>2</i>	<i>55</i>	<i>1</i>	<i>2</i>
Билирубин	30	1	50	1	13
<i>Прочие (простат- специфический антиген, диареи и др.)</i>	<i>15</i>	<i>1</i>	<i>20</i>	<i>1</i>	<i>7</i>
Итого	2280		3200		8
Самодиагностика	2780		4850		11
Всего	5060		8050		10

Что можно ожидать в этом десятилетии?

- **Дальнейшее внедрение в лабораторную практику существующих твердофазных и гомогенных методов иммунохимического анализа**
- **Развитие системы быстрой диагностики на приеме у врача и в домашних условиях на основе иммунохроматографических тестов**
- **Завершение разработок и внедрение в практику иммуносенсоров для мультипараметрического анализа биопроб**
- **Совершенствование технологии и примеры успешного практического использования иммуночипов**
- **Развитие научных исследований в области иммунонанотехнологий**

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Тел./Факс 954-28-04



119071, Москва, Ленинский проспект, 33

www.inbi.ras.ru

E-mail: dzantiev@inbi.ras.ru

