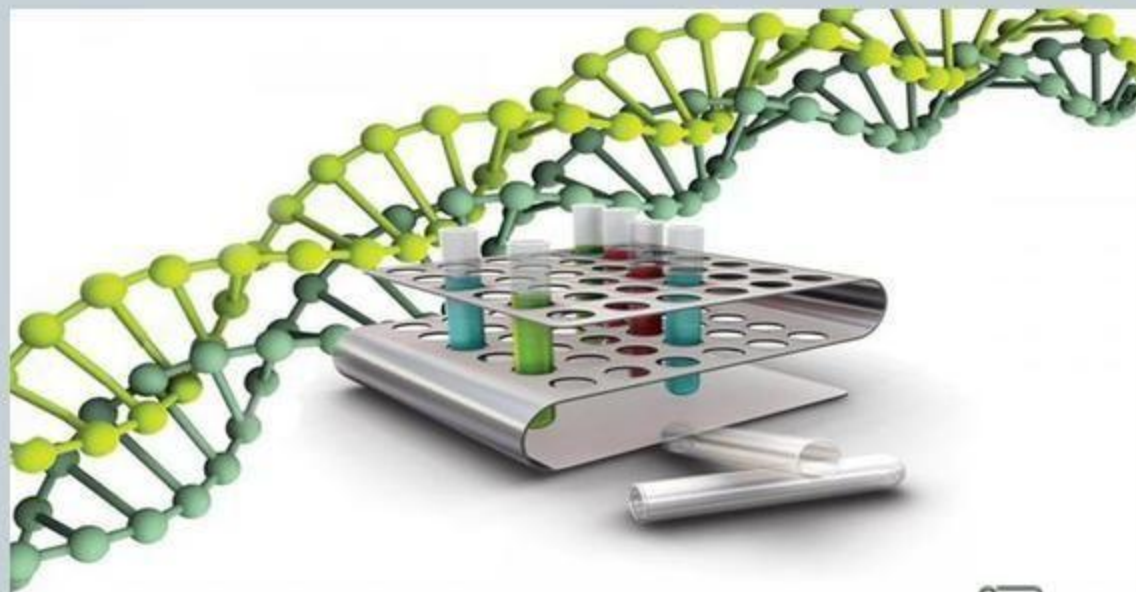


Метод ПЦР и ИФА в диагностике инфекционных заболеваний

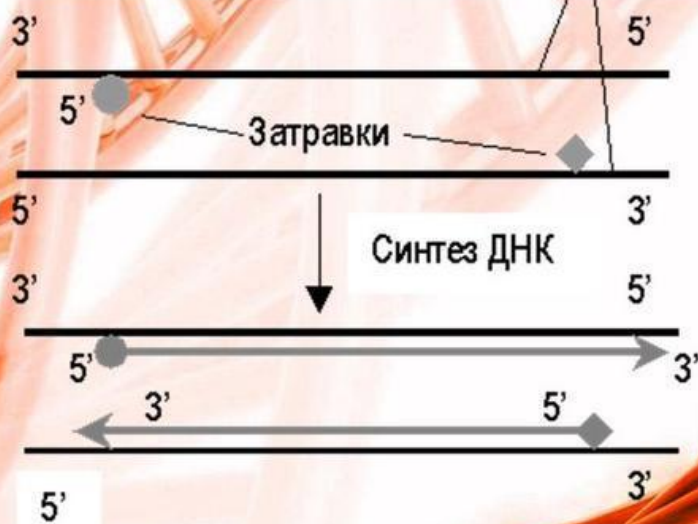




В 1983 году Кэри Мюллис с сотрудниками разработал метод клонирования последовательностей ДНК *in vitro*, который получил название полимеразной цепной реакции (ПЦР).

ПЦР – метод амплификации, т.е. получения большого числа копий нужного гена или его фрагмента в условиях *in vitro*.
Реакционная смесь для получения нужной ДНК содержит: исследуемую ДНК-матрицу, субстраты реакции – 4 дНТФ, 2 праймера, термостабильную Таq-полимеразу и реакционный буфер (кофактор – Mg^{2+}).

Разделившиеся комплементарные цепи ДНК





Эти этапы повторяются многократно в приборе – амплификаторе (термоциклере), что позволяет получить огромное количество копий нужного фрагмента ДНК. Так, в результате проведения 20 циклов ПЦР анализируемый участок ДНК амплифицируется более чем в миллион раз.

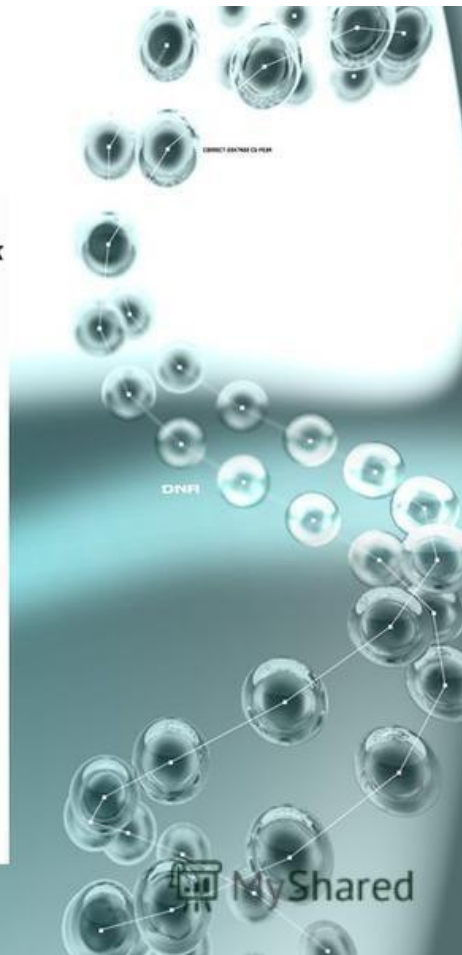
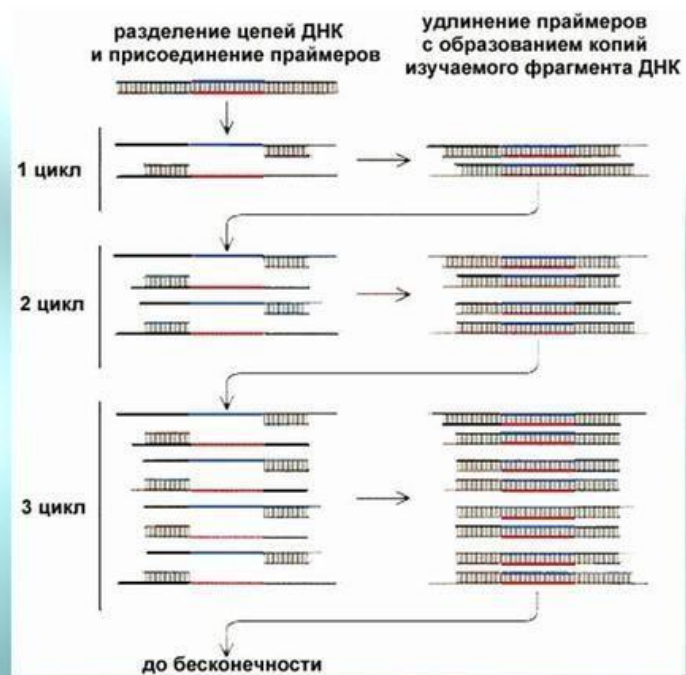


Современный амплификатор Corbett (вид 1)



Современный амплификатор Corbett (вид 2)

Общая схема амплификации изучаемого фрагмента ДНК





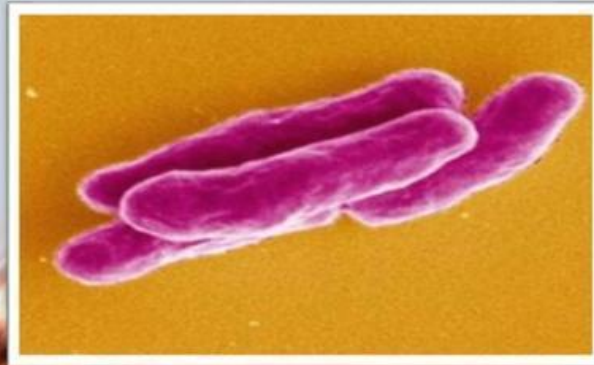
Широкое распространение метод ПЦР в настоящее время получил как метод диагностики различных инфекционных заболеваний. ПЦР позволяет выявлять этиологию инфекции, даже если в пробе содержится всего несколько молекул ДНК возбудителя. ПЦР широко используется для ранней диагностики ВИЧ-инфекции, вирусных гепатитов, клещевого энцефалита, туберкулеза, венерических заболеваний и т.д.

Этот метод имеет большое значение для мониторинга и оценки эффективности терапии, особенно при вирусных заболеваниях. Определение «вирусной нагрузки» позволяет осуществить индивидуальный подбор дозы противовирусных препаратов. При помощи ПЦР удается выявить отдельные субтипы и штаммы вирусов и бактерий, обладающих повышенной устойчивостью к тем или иным лекарственным препаратам.



Размноженный *in vitro* фрагмент получают в количествах, достаточных для его прямого секвенирования.

Такой подход является наиболее информативным при диагностике внутриклеточных паразитов и медленно растущих микроорганизмов, требующих сложных условий культивирования, например, возбудителей туберкулеза – *Mycobacterium tuberculosis*.



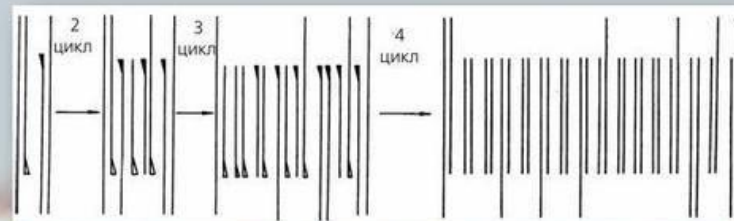


В качестве примера для идентификации микобактерий группы туберкулеза можно привести праймеры, фланкирующие фрагмент размером 245 н.п. (нуклеотидных пар) мигрирующего элемента IS-986, содержащегося в геноме *M. tuberculosis* в числе 2 – 8 копий.

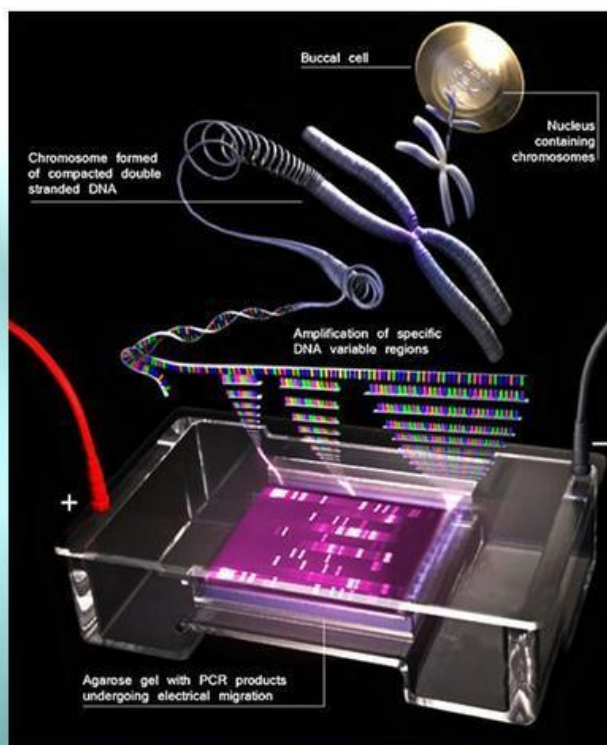
Последовательность праймеров:

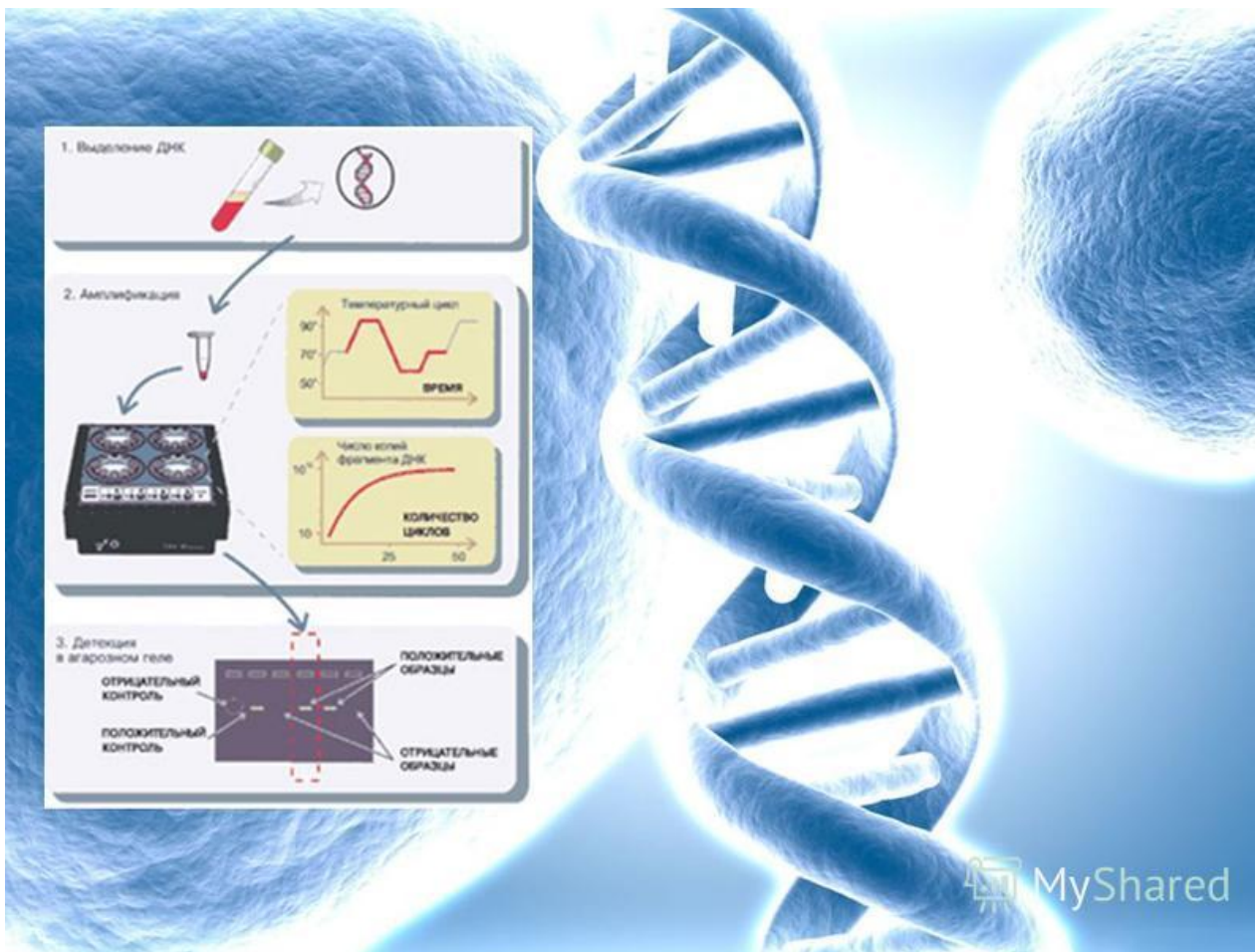
INS1 5' - CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC - 3'

INS2 5' - GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA - 3'



Аmplificированный фрагмент выявляют в процессе электрофореза в 1,6 % агарозном геле





Достоинства метода ПЦР:



- среди методов диагностики инфекционных возбудителей ПЦР обладает наиболее высокими показателями чувствительности и специфичности (для Ампли-Сенс ПЦР-систем – 1000 микроор-мов/1 мл);
- возможность использования разнообразного клинического материала;
- возможность одновременного выявления нескольких микроорганизмов в одной биологической пробе, в отличие от бактериологических методов, где для разных возбудителей используются разные способы культивирования;



- повышенная стабильность при транспортировке, т.к. нет необходимости сохранять возбудителя в живом виде;
- скорость проведения анализа (иногда < 24 ч.);
- точное определение этиологии инфекции;
- определение количества возбудителя, это особенно актуально для условно-патогенных микроорганизмов, которые вызывают патологию только при определенных условиях;
- проведение контроля за течением инфекционного процесса.

С другой стороны, метод ПЦР, как и любой другой тест молекулярной диагностики, во многом зависит от правильности забора и транспортировки исследуемого материала.

Иммуноферментный анализ

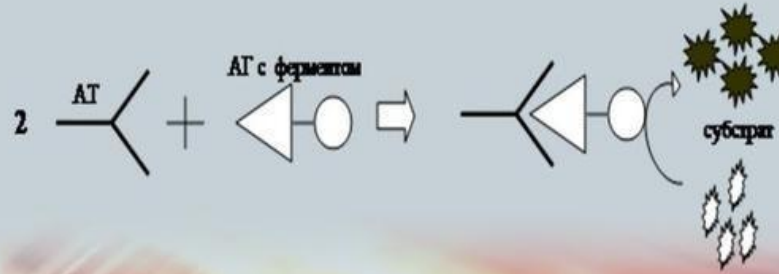
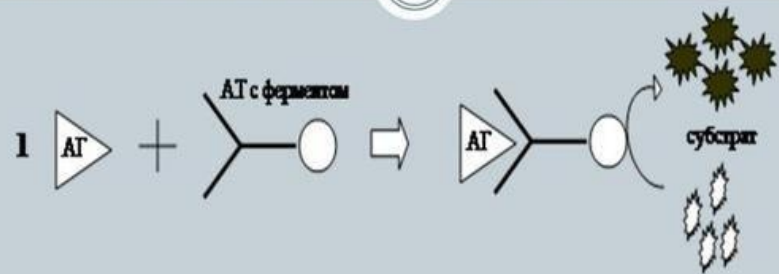


- (сокращённо **ИФА**, англ. *enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA*) — лабораторный иммунологический метод качественного или количественного определения различных соединений, макромолекул, вирусов и пр., в основе которого лежит специфическая реакция антиген-антитело. Выявление образовавшегося комплекса проводят с использованием фермента в качестве метки для регистрации сигнала. В настоящее время является одним из основных методов лабораторной диагностики.

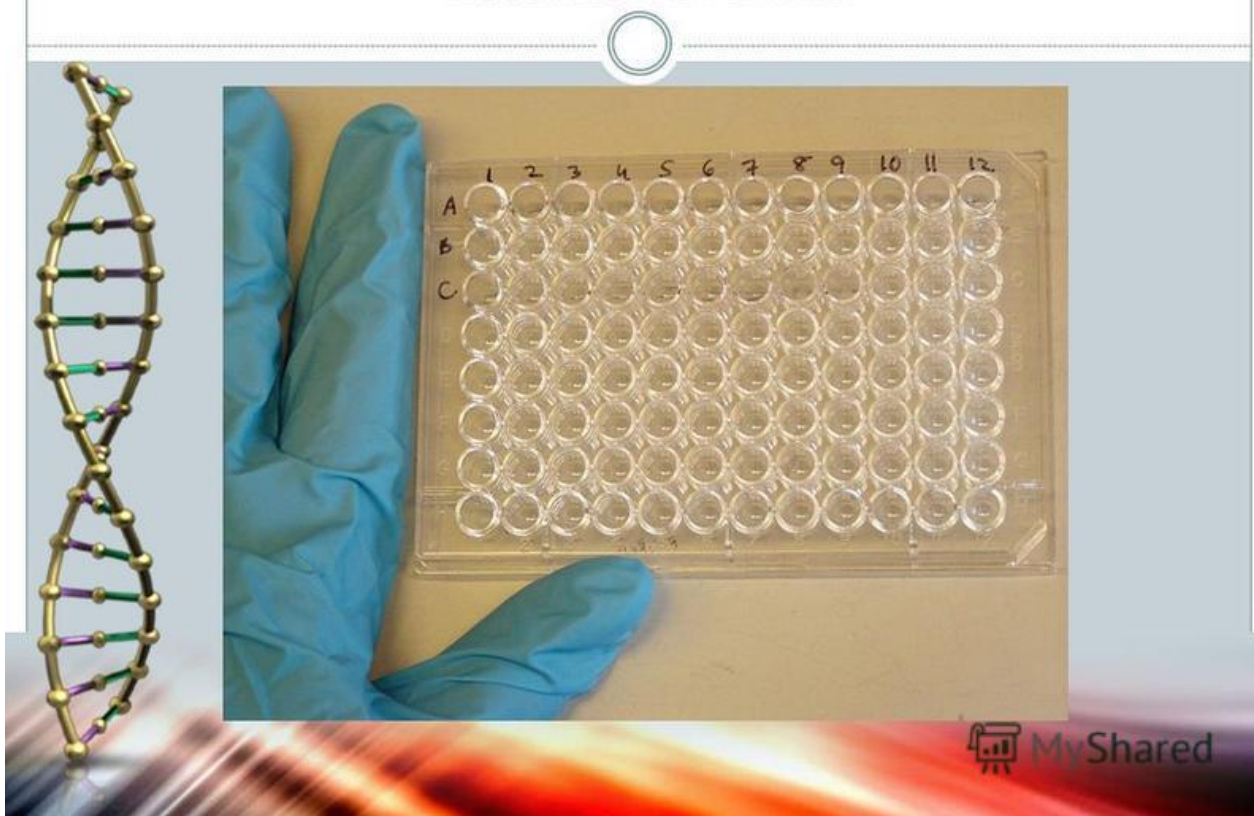


- ИФА появился в середине 60-х годов и первоначально был разработан как метод для идентификации антигена в гистологическом препарате, а также для визуализации линий преципитации в тесте иммунодиффузии и иммуноэлектрофореза, а затем стал использоваться для количественного определения антигенов и антител в биологических жидкостях. В разработке метода принимали участия Е. Энгвалл и Р. Пэлман, а также независимо от них В. Ван Веeman и Р. Шурс.

Основной принцип ИФА



96 ячеечный микропланшет, используемый для постановки ИФА



Любой вариант ИФА содержит 3 обязательные стадии:



1. стадия узнавания тестируемого соединения специфическим к нему антителом, что ведет к образованию иммунного комплекса;
2. стадия формирования связи конъюгата с иммунным комплексом или со свободными местами связывания;
3. стадия превращения ферментной метки в регистрируемый сигнал.

Виды ИФА



• **Непрямой иммуноферментный анализ (indirect ELISA)**

Метод непрямого иммуноанализа характеризуется осуществлением 3-х стадийного процесса, на первой стадии которого антиген адсорбируется на специально подготовленном пластике, на второй с антигеном взаимодействуют специфичные к нему антитела, а на третьей в систему вводят антивидовые антитела, конъюгированные с ферментом, обуславливающим проведение индикаторной ферментативной реакции. В данной методике в качестве фермента используют пероксидазу хрена. Реакция проводится в специальных 96-луночных планшетах.

Прямой иммуноферментный анализ (direct ELISA)

Методика прямого иммуноанализа имеет лишь небольшие отличия по сравнению с методикой непрямого иммуноанализа. Так, стадии I и II одинаковы в обоих типах анализа. Отличие заключается в том, что в прямом варианте иммуноанализа на стадии III используют специфичные антитела, конъюгированные с ферментной меткой. При необходимости также можно проводить раститровку специфичных антител, конъюгированных с ферментной меткой, аналогично описанному ранее для неконъюгированных антител. Стадия IV опускается, а дальнейшие стадии (V-VII) проводятся аналогично описанному выше для непрямого варианта иммуноанализа.

Иммуноанализ сэндвич-типа (Sandwich-type immunoassay)

В данном варианте иммуноанализа используется пара антител, специфичных к пространственно удаленным эпитопам исследуемого антигена.

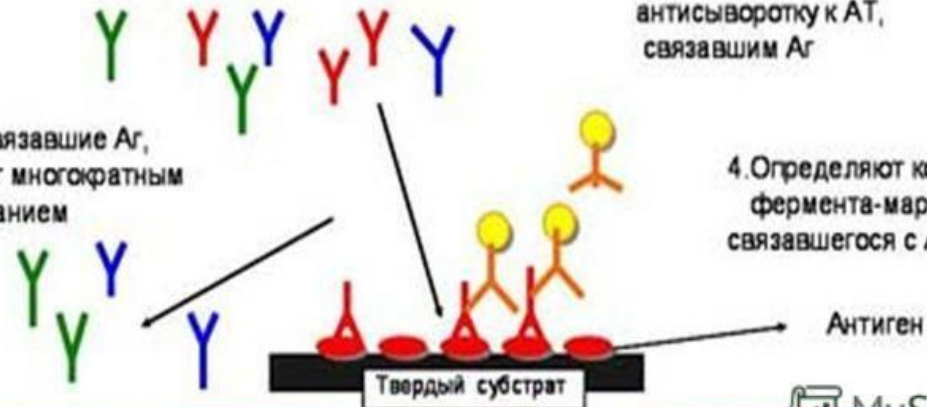
Прямой твердофазный ИФА (схема)

1. Сыворотку инкубируют с Ag, фиксированным на твердом субстрате (пластиковая микропланшетка)

3. Вносят меченную ферментом антисыворотку к АТ, связавшим Ag

2. АТ, не связавшие Ag, удаляют многократным промыванием

4. Определяют количество фермента-маркера, связавшегося с АТ



Непрямой метод

АТ-положительная сыворотка



АТ-отрицательная сыворотка



Расшифровка результатов анализа



- Иммуноферментный анализ крови позволяет выявить антитела разных видов. Это иммуноглобулины класса А, М, G. Накопление данных антител происходит в различные промежутки времени. Например, первыми после начала заболевания (на пятый день) начинают накапливаться **иммуноглобулины класса М**. Эти иммуноглобулины циркулируют в организме примерно 5-6 недель, после чего постепенно исчезают. В этот временной промежуток и выявляются иммуноглобулины данного класса. Примерно через 3-4 недели после заболевания появляются **иммуноглобулины G**, которые могут задерживаться в организме человека в течение нескольких месяцев. Однако этого может и не отмечаться. При проведении иммуноферментного анализа может отмечаться возрастание иммуноглобулинов G, что свидетельствует о наличии инфекционного процесса или реинфекции.
- **Иммуноглобулины А** обнаруживаются в **крови** на протяжении 2-4 недель, однако всего 20% из них находятся в сыворотке крови, остальные 80% содержатся в секрете слизистых оболочек. Как правило, антитела класса А исчезают в период времени от 2 недель до 2 месяцев. Такая динамика свидетельствует об уничтожении инфекционного процесса. Если же после выздоровления результат иммуноферментного анализа все равно показывает наличие иммуноглобулинов А, то это свидетельство хронизации инфекционного процесса.



• **Преимущества иммуноферментного анализа**

- ❖ высокая чувствительность и точность метода;
- ❖ возможность проведения ранней диагностики, поскольку ИФА позволяет определять классы иммуноглобулинов при анализе;
- ❖ прослеживание динамики инфекционного процесса;
- ❖ возможность получения быстрого ответа;
- ❖ удобство метода.

• **Недостатки**

- Основным недостатком иммуноферментного анализа является тот факт, что в редких случаях метод выдает ложноотрицательные или ложноположительные результаты.