

*Современные
лабораторные технологии
(ИФА, ПЦР, проточная
цитометрия)*

*Подготовила - Кажимова А.
Проверил (а) – Омарова Л.А.*

Иммуноферментный анализ (ИФА) - это лабораторное исследование, основанное на реакции «антиген-антитело». Суть этого лабораторного метода - выявление специфических антител с помощью специальных биохимических реакций, которые помогают определить присутствие или отсутствие антител и их количество.

Методом ИФА можно определить уровень гормонов, иммуноглобулинов, иммунологических комплексов и других биологически активных веществ.

Принцип проведения иммуноферментного анализа крови

При попадании в организм человека чужеродного агента (антигена) система иммунитета начинает вырабатывать специфические белки (антитела), которые необходимы для уничтожения антигенов. Антитела избирательно связываются с антигенами, образуя комплексы антиген-антитело. В ходе иммуноферментного анализа именно данный комплекс и подвергается качественному и количественному анализу. К примеру, если необходимо выявить определенный вирус (а точнее его антиген) в крови, в нее добавляют специфические к вирусу антитела. Наоборот, для выявления антител в образцы крови добавляются специфические антигены.

Материалом для проведения иммуноферментного анализа является кровь, взятая из вены. Помимо крови для ИФА могут понадобиться околоплодные воды и материал стекловидного тела.

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.

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.

ПЦР

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — экспериментальный метод молекулярной биологии, способ значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе).

В основе метода ПЦР лежит многократное удвоение определённого участка ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*). В результате нарабатываются количества ДНК, достаточные для визуальной детекции. При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце.

Кроме простого увеличения числа копий ДНК (этот процесс называется амплификацией), ПЦР позволяет производить множество других манипуляций с генетическим материалом (введение мутаций, сращивание фрагментов ДНК), и широко используется в биологической и медицинской практике, например, для диагностики заболеваний (наследственных, инфекционных), для установления отцовства, для клонирования генов, введения мутаций, выделения новых генов.

Специфичность и применение ПЦР - метод молекулярной диагностики, ставший для ряда инфекций «золотым стандартом», проверен временем и тщательно апробирован клинически. Метод ПЦР позволяет определить наличие возбудителя заболевания, даже если в пробе присутствует всего несколько молекул ДНК возбудителя.

ПЦР позволяет диагностировать наличие долго растущих возбудителей, не прибегая к трудоёмким микробиологическим методам, что особенно актуально в гинекологии и урологии при диагностике урогенитальных инфекций, передающихся половым путем (ИППП).

Для проведения ПЦР в простейшем случае требуются следующие компоненты:

- ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать;
- два праймера, комплементарные концам требуемого фрагмента;
- термостабильная ДНК-полимераза;
- дезоксинуклеотидтрифосфаты (А, G, C, T);
- ионы Mg^{2+} , необходимые для работы полимеразы;
- буферный раствор.

ПЦР проводят в амплификаторе — приборе, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок, обычно с точностью не менее $0,1^{\circ}C$. Чтобы избежать испарения реакционной смеси, в пробирку добавляют высококипящее масло, например, вазелиновое. Добавление специфических ферментов может увеличить выход ПЦР-реакции.

Ход реакции Обычно при проведении ПЦР выполняется 20 - 35 циклов, каждый из которых состоит из трех стадий. Двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до 94 - 96°C (или до 98°C, если используется особенно термостабильная полимераза) на 0,5 - 2 минуты, чтобы цепи ДНК разошлись. Эта стадия называется **денатурацией** — разрушаются водородные связи между двумя цепями. Иногда перед первым циклом проводят предварительный прогрев реакционной смеси в течение 2 - 5 минут для полной денатурации матрицы и праймеров.

Когда цепи разошлись, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей. Эта стадия называется **отжигом**. Температура отжига зависит от праймеров и обычно выбирается на 4 - 5°C ниже их температуры плавления. Время стадии — 0,5 - 2 минут.

ДНК-полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве затравки. Это — стадия **элонгации**. Температура элонгации зависит от полимеразы. Часто используемые полимеразы наиболее активны при 72°C. Время элонгации зависит как от типа ДНК-полимеразы, так и от длины амплифицируемого фрагмента. Обычно время элонгации принимают равным одной минуте на каждую тысячу пар оснований. После окончания всех циклов часто проводят дополнительную стадию финальной элонгации, чтобы достроить все одноцепочечные фрагменты. Эта стадия длится 10 - 15 мин.

Проточная цитометрия

Проточная цитометрия (ПЦ) представляет собой технику для быстрого оптического анализа отдельно взятых клеток.

Методика заключается в выявлении рассеяния света лазерного луча при прохождении через него клетки в струе жидкости, причём, степень световой дисперсии позволяет получить представление о размерах и структуре клетки. Кроме того, в ходе анализа учитывается уровень флуоресценции химических соединений, входящих в состав клеточной стенки (аутофлуоресценция) или внесённых в образец перед проведением проточной цитометрии.

Методика обладает целым рядом **преимуществ** перед традиционной цитометрией, в числе которых:

- возможность исследования в ходе одного анализа значительно большего числа клеток (более 100000, тогда как микроскопия позволяет исследовать только несколько сотен клеток), что позволяет получать статистически достоверные результаты и выявлять редкие типы клеток;
- возможность проведения количественных измерений путем дифференцировки интенсивности рассеяния/флуоресценции при различных длинах волн;
- возможность одновременного исследования различных характеристик и структурных компонентов одной клетки.

Типичный аппарат для проведения проточной цитометрии позволяет определять до 5-10 различных параметров клетки, таких как размер, содержание белков, ДНК, липидов, антигенные свойства, активность ферментов и т.п. Кроме того, исследование отдельно взятых клеток даёт возможность выявить и оценить степень гетерогенности популяции, что не всегда может быть достигнуто другими методами.

В настоящее время проточная цитометрия применяется для выявления определённых клеток в исследуемых образцах (как бактериальных и грибковых, так и собственных клеток организма человека), определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам, а также мониторинга состояния вирусного процесса у ВИЧ-инфицированных пациентов.

Проточная цитометрия позволяет не только выявлять инфицирование микроорганизмами, но и определять спектр их чувствительности, причём, длительность исследования не превышает нескольких часов. Подвергнутые воздействию антибиотиков (*in vivo* или *in vitro*) микроорганизмы сравнивают с контрольными образцами того же штамма для установления их жизнеспособности, а также изменений в нуклеиновых кислотах, белках, оболочке клеток и т.п., что позволяет оценить как степень эффекта антибиотика, так и точку приложения его действия.

Ещё одной областью применения проточной цитометрии является мониторинг состояния вирусного процесса у ВИЧ-инфицированных лиц путём определения абсолютного количества CD4+ клеток и их доли в популяции лимфоцитов.