

## **МЕТОД ИММУНО-ПЦР В ДИАГНОСТИКЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ И ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт

Иммуно-ПЦР (И-ПЦР) объединяет возможности двух современных диагностических методов: иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции (ПЦР). Такое сочетание обуславливает 100-10000-кратное увеличение чувствительности по сравнению с аналогичным ИФА. В обзоре рассмотрены основные варианты И-ПЦР, приведены примеры возможного использования метода для ранней и ретроспективной диагностики различных заболеваний.

Журн. микробиол., 2019, № 3, С. 110—117

Ключевые слова: иммуно-ПЦР, иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция, связывающие антитела, детектирующие антитела, ДНК-метка

*I.A.Barkova, A.M.Barkov, D.V.Viktorov*

## **METHOD OF IMMUNO-PCR IN DIAGNOSTICS OF BACTERIAL AND VIRAL INFECTIONS**

Volgograd Research Institute for Plague Control, Russia

Immuno-PCR (I-PCR) combines the capabilities of two modern diagnostic methods of enzyme immunoassay (ELISA) and polymerase chain reaction (PCR), combination these methods causes a 100-10000 fold increase in sensitivity compared to a similar ELISA. The review considers the main variants of I-PCR, gives examples of possible use of the method for early and retrospective diagnosis of various diseases.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 3, P. 110—117

Key words: immuno-PCR, enzyme immunoassay, polymerase chain reaction, capturing antibodies, detecting antibodies, DNA label

ПЦР-амплифицированный иммуноанализ или иммуно-ПЦР (И-ПЦР) представляет собой метод, сочетающий универсальность иммуноферментного анализа (ИФА) с чувствительностью ПЦР. ИФА является часто используемым методом для обнаружения антигенов (АГ), но он не пригоден при низкой концентрации аналита, ПЦР не может обнаруживать молекулы, не являющиеся нуклеиновыми кислотами [29, 32]. Чувствительность И-ПЦР выше ИФА в  $10^2$ - $10^4$  раза. Дизайн И-ПЦР в основном сходен с ИФА, но вместо антивидового конъюгата, меченого ферментом, используется детектирующее антитело (ДА), меченное фрагментом ДНК (ДНК-метка). Определение ДНК-метки производится методом электрофореза или ПЦР в реальном времени. В зависимости от цели исследования И-ПЦР может проводиться в различных вариантах: прямой И-ПЦР, непрямой И-ПЦР, сэндвич-И-ПЦР и непрямой сэндвич-И-ПЦР, в качестве линкера, соединяющего биотинилированное ДА с биотинилированной репортерной ДНК-меткой, используют стрептавидин. В прямом и непрямом И-ПЦР на лунках микротитровальной пластины сорбируют АГ [8, 20, 39]. В сэндвич- и непрямом сэндвич-И-ПЦР на лунках микротитровальной пластины сорбируют антигенспецифические связывающие (capture antibody) антитела (СА) [10, 28].

Предварительная подготовка конъюгатов ДНК-АТ упрощает проведение реакции, при этом отпадает необходимость в ряде инкубационных этапов и снижается

степень неспецифического связывания реагентов [26]. Стрептавидин-биотиновые конъюгаты подходят для всех форматов И-ПЦР, для их создания преимущественно предлагается использовать олигонуклеотид, биотинилированный с одного конца. Niemeier С.М. et al. впервые описали надмолекулярные комплексы, формируемые из биотинилированных с двух концов фрагментов двухцепочечной ДНК, стрептавидина и антител [33]. Рязанцев Д.Ю. с соавторами усовершенствовали методику получения комплексов на основе относительно коротких (60—70 н.) одноцепочечных олигонуклеотидов, биотинилированных с 5'- и 3'-концов, и стрептавидина. Использование подобных надмолекулярных комплексов позволяет усилить специфический сигнал за счет того, что на одну молекулу ДА приходится десятки, а то и сотни молекул ДНК-метки; кроме этого важно, что такая система универсальна [23, 36].

Эффективным способом конъюгации ДА и ДНК является ковалентное связывание. В качестве линкера может быть использовано химическое соединение, такое как succinimidyl 4-[N-maleimidomethyl]-cyclohexane-1-carboxylate (SMCC), что позволяет уменьшить количество промывок по сравнению с анализом на основе стрептавидин-биотин [20, 38]. В настоящее время стали доступны готовые к использованию ковалентные конъюгаты, производимые фирмами Innova Biosciences, Chimera Biotec, или наборы для их изготовления (Thunder-Link® Innova Biosciences; Imperacer® Chimera Biotec). Компания Chimera Biotec представляет конъюгаты АТ-ДНК, имеющие разнообразную специфичность: антиротавирусные [4], против тау-белка, используемого для диагностики болезни Альцгеймера [22] и др.

Преимуществом сэндвич-И-ПЦР по сравнению с прямым И-ПЦР является отсутствие необходимости прямой сорбции антигена из биологических образцов, что снижает неспецифическое связывание и уровень фонового сигнала [26, 33]. Другим способом решения данных проблем является выбор подходящего блокирующего раствора (бычьего сывороточного альбумина, казеина, обезжиренного молока и др.).

Разработаны модификации И-ПЦР анализа на основе фагового дисплея, магнитных гранул, наночастиц золота. Использование магнитных гранул и наночастиц золота в качестве носителя для СА позволяет более тщательно промывать связанный АГ, а также способствует более быстрому взаимодействию между СА и соответствующим АГ [3, 5, 6, 26, 34]. Фаг дисплей-опосредованный И-ПЦР анализ (Phage display-mediated I-PCR; PD-I-PCR) впервые был описан Guo Y.C. et al. [15]. На поверхности рекомбинантного бактериофага M13 экспонируется одноцепочечный варибельный фрагмент антитела (single-chain; scFv) или белок, специфично взаимодействующий с определяемым агентом. Фаговая ДНК выделяется при нагревании и служит в качестве ПЦР-матрицы для амплификации [21, 30].

В И-ПЦР анализе на основе магнитных гранул (Magnetic bead based I-PCR) СА адсорбируется на магнитных шариках для захвата антигена, а затем используется формат сэндвич-И-ПЦР с использованием стрептавидина в качестве линкера между ДА и репортерной ДНК [6].

Дизайн И-ПЦР анализа с использованием наночастиц золота (Gold nanoparticle I-PCR; GNP-I-PCR): СА, адсорбированные на лунках микротитровальной пластины, связываются с АГ, детекция СА-АГ происходит за счет GNP-зонда. GNP-зонд состоит из ДА, ноночастицы золота, несущей ДНК-метку, которая содержит два фрагмента связывающий и сигнальный. Сигнальная ДНК высвобождается при нагревании и количественно оценивается в ПЦР [9].

И-ПЦР анализ с амплификацией на наночастицах (Nanoparticle-amplified I-PCR (NPA-I-PCR) получил название биобаркодинг (biobarcoding assay). Для его про-

ведения используются одновременно магнитные микрочастицы и золотые наночастицы. Магнитные частицы покрывают SA, а золотые — DA и ДНК-меткой. Анализ проводится в формате «сэндвич», образующиеся при этом иммунокомплексы подвергаются магнитной сепарации, после чего от золотых наночастиц при нагревании отщепляется ДНК-метка и детектируется в ПЦР в реальном времени [34].

Хотя метод И-ПЦР применяют уже почти 25 лет, широкую популярность он приобрел у исследователей лишь с 2009 года, в связи с чем, общее число публикаций невелико [36]. Мы не ставили целью описать все особенности, достоинства и недостатки И-ПЦР, а лишь перечислили основные варианты анализа, применяемые в диагностике бактериальных и вирусных инфекций.

И-ПЦР может явиться высокочувствительным лабораторным тестом для ранней диагностики инфекций, вызванных медленно растущими бактериями, требовательными к условиям культивирования. Уровень токсинов, продуцируемых микроорганизмами, не коррелируется с концентрацией возбудителя, что делает метод И-ПЦР уникальным для высокочувствительного определения токсинов в исследуемом образце.

Chang T.S. и Huang S.H. являются авторами сэндвич И-ПЦР для обнаружения  $\beta$ -глюкуронидазы *Escherichia coli*, которая является специфическим маркером для идентификации *E. coli*. Чувствительность составила 0,00001 пг/мл (эквивалентно 40 молекулам глюкуронидазы в мл), что было в  $10^8$  раз более чувствительным, чем ИФА [7].

Энтерогеморрагическая *E. coli* O157:H7 является возбудителем пищевой токсикоинфекции у людей. Шига-токсин 2 типа (Stx2) считается главной причиной угрожающего жизни гемолитико-уремического синдрома. He X. et al. разработали варианты И-ПЦР в реальном времени для обнаружения Stx2 в контаминированных образцах окружающей среды. В первом варианте были использованы коммерческие моноклональные антитела, при этом чувствительность анализа составила 0,1 пг/мл при определении токсина в фосфатно-буферном растворе, что было в 10000 раз более чувствительным, чем ИФА. Во втором варианте на основе моноклональных антител Stx2-1 и Stx2-2, разработанных авторами, Stx2 в пробах молока был определен в количестве 0,01 пг/мл [16].

*Streptococcus pyogenes* является возбудителем острого фарингита, пневмонии, сепсиса, ревмокардита и гломерулонефрита. Liang H. et al. использовали моноклональные антитела к группоспецифическому углеводу клеточной стенки, предел обнаружения И-ПЦР составил 10 бактериальных клеток на лунку [20].

*Staphylococcus aureus* высвобождает мощный фактор вирулентности, протеин А, который, как известно, ингибирует фагоцитоз посредством связывания Fc-фрагмента иммуноглобулина. Кроме того, *S. aureus* продуцирует токсины, которые являются членами семейства суперантигенов, такие как токсин синдрома токсического шока (TSST), стафилококковые энтеротоксины А (SEA), В (SEB). Huang S.H. и Chang T.S. описали сэндвич-И-ПЦР для идентификации SEA с пределом обнаружения  $10^{-17}$  г/мл (144 молекулы антигена в мл) [17]. Количественный И-ПЦР анализ для обнаружения SEB в чистой культуре и различных продуктах питания, разработанный Rajkovic A. et al., имел чувствительность менее 10 пг/мл. Это примерно в 10 000 выше, чем предел обнаружения набора для флуоресцентного иммуноанализа «VIDAS SET2» BIOMERIEUX [35]. Fischer A. et al. представили И-ПЦР анализ с использованием линкера N-succinimidyl-S-acetyl-thioacetate (SATA) для выявления SEB и SEA. Чувствительность для SEB составила 0,6 пг, а для SEA 6 пг [14]. Рязанцевым Д.Ю. с соавторами были разработаны надмолекулярные комплексы бисбиотинилирован-

ных олигодеоксинуклеотидов со стрептовидином, которые были использованы в качестве ДНК-метки в тест-системе для определения SEA и TSST. Чувствительность при определении токсинов в супернатантах культур *S.aureus* составила не менее 10 пг/мл, при 100% специфичности [23, 26].

Ботулизм — тяжелое инфекционное заболевание, характеризующееся поражением нервной системы, преимущественно продолговатого и спинного мозга, протекающее с преобладанием офтальмоплегического и бульбарного синдромов. Wu H.C. et al. для обнаружения нейротоксина A *Clostridium botulinum* (BoNT/A) разработали прямой И-ПЦР анализ, в котором SMCC использовали в качестве молекулы линкера для ковалентного связывания моноклональных антител против BoNT/A с репортерной ДНК [38]. Chao H.Y. et al., используя непрямой И-ПЦР и непрямой сэндвич И-ПЦР, зафиксировали предел обнаружения для BoNT/A до 50 фг в обоих тестах, что в  $10^4$ - $10^5$  раз чувствительнее ИФА. Такая чувствительность была достигнута использованием моноклональных антител с высокой аффинностью к BoNT/A в качестве СА [8]. Сотрудниками ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболенск) в 2014 году зарегистрирован «Набор реагентов для определения ботулинистического нейротоксина типа А методом И-ПЦР» (Регистрационное удостоверение № РЗН 2014/1424). Предел обнаружения для BoNT / А составлял 100 фг [19].

За последние два десятилетия во всем мире отмечается увеличение заболеваемости туберкулезом. Вовремя начатая специфическая терапия позволяет избежать распространения заболевания и летальных исходов. Mehta P.K. et al. разработали непрямой сэндвич-анализ И-ПЦР для выявления специфических антигенных мишеней *Mycobacterium tuberculosis* (ESAT-6 — ранний секреторный антиген; CFP10 и CFP21 — белки культурального фильтрата 10 и 21; белок, выделенный из различных штаммов MPT-64) в биологических образцах пациентов с легочным и внелегочным туберкулезом, с помощью которого можно обнаружить до 0,1 фг очищенных антигенов *M. tuberculosis*, что превышает чувствительность аналогичного ИФА в  $10^7$  раз [28].

Метод И-ПЦР незаменимым в такой интересной отрасли науки, как палеомикробиология, которая позволяет выявить возбудителей давно минувших пандемий, их временное и географическое распространение, отслеживать генетическую эволюцию микроорганизмов. История человечества насчитывает три пандемии чумы: Юстинианская (541-750 гг.), средневековая «Черная смерть», поразившая Европу в 1346 — 1353 гг., чума конца XIX — начала XX веков считается третьей особо крупной пандемией. Зубная пульпа оказалась более надежным источником ДНК, чем кости скелета. Однако, как показали исследования, ДНК микроорганизмов более подвержена загрязнению, химическим модификациям, чем белковые последовательности. В 2013 г. французскими учеными впервые был описан И-ПЦР анализ для обнаружения *Yersinia pestis* в пульпе зубов, извлеченных из древних захоронений. Предел обнаружения чумного антигена в фосфатном буферном растворе был в 70 раз выше, по сравнению с ИФА, специфичность составила 100% [27].

Мелиоидоз обычно диагностируется путем выделения и идентификации *Burkholderia pseudomallei* из мокроты, мочи, образцов крови и экссудатов ран. Клинические диагностические тесты включают агглютинацию, непрямую геммагглютинацию, фиксацию комплемента, иммунофлуоресцентный анализ и ИФА.

Соорег A. et al. описали ультрачувствительное обнаружение антител с использованием И-ПЦР-анализа на основе «Tus-Tet-lock» [11, 31] и ИФА. В качестве антигена были использованы фракции из штамма *B. pseudomallei* K96243, выделенные с помощью авторской методики экстракции. Данные методы позволяли обнаружи-

вать антитела в сыворотках, которые были отрицательны в реакции гемагглютинации [9].

Группой ученых из Индии были разработаны методы ИФА и И-ПЦР для детекции возбудителя сибирской язвы. Моноклональные антитела против белка EA 1 (extractable antigen) использовались в качестве СА. После инкубации с исследуемыми штаммами в вегетативной или в споровой форме лунки планшета промывали фосфатно-солевым буферным раствором для удаления несвязанных клеток. В каждую лунку добавляли 100 мкл горячего раствора Tris-Cl (10 мМ) для удаления связанных клеток. 10 мкл образца, содержащего клетки, использовали для выполнения дуплексной ПЦР, с двумя наборами праймеров к факторам вирулентности *Bacillus anthracis* протективному антигену и капсуле. Данный И-ПЦР анализ с использованием моноклональных антител к белку EA1, разработанных в настоящем исследовании, позволял обнаруживать 10 и 100 КОЕ/мл бактериальных клеток и спор соответственно [25]. При помощи вышеописанных методов была успешно расследована вспышка сибирской язвы среди крупного рогатого скота в природных национальных парках Индии в январе 2013 года [18].

Особенностью сибирезывенной инфекции является протекающий практически бессимптомно ранний этап синтеза компонентов сибирезывенного токсина и последующий быстрый переход инфицированного организма в так называемую «точку невозврата», при которой эффективность традиционно применяемой терапии антибиотиками не способна скомпенсировать развитие токсической патологии. Сотрудниками ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболensk) разработаны и внедрены в практику ряд И-ПЦР тест-систем для диагностики сибирской язвы: «Набор реагентов для определения летального фактора возбудителя сибирской язвы методом И-ПЦР» (РУ № РЗН 2014/1470); «Набор реагентов для определения протективного антигена возбудителя сибирской язвы методом И-ПЦР» (РУ № РЗН2014/1464). Тест-системы сконструированы в формате сэндвич-И-ПЦР, комплекс белка токсина с биотилированным ДА выявляют с использованием нековалентного конъюгата фрагментов ДНК с нейтравидином, служащим матрицей для проведения ПЦР-амплификации с флуоресцентной детекцией сигнала в режиме реального времени. По изменению уровня флуоресценции в соответствующих лунках планшета или пробирках стрипа против контрольных определяют присутствие токсинов в исследуемых образцах. Способы определения летального фактора и протективного антигена сибирской язвы характеризуется высокой чувствительностью (0,1 пМ) и специфичностью, позволяющей провести диагностику на ранних стадиях заражения сибирской язвой, своевременно начать антибиотикотерапию инфицированного [1, 2].

Преимущества универсального метода И-ПЦР позволили ему найти свое место в диагностике вирусных инфекций. В число маркеров инфицирования вирусом гепатита В входят поверхностный антиген (HbsAg), коровый антиген (HВсAg), е-антиген (HВеAg), антитела к данным антигенам и вирусная ДНК. Концентрация HВсAg в сыворотке прямо пропорциональна уровню вирусной ДНК и может быть использована для определения вирусной нагрузки. Maia M. et al. были первыми исследователями, разработавшими сэндвич-И-ПЦР анализа для обнаружения HВсAg с очень высокой чувствительностью 0,5 пг HВсAg в образцах сыворотки крови [24]. Monjezi R. et al. предложили определение HВсAg методом И-ПЦР с использованием технологии фагового дисплея на основе рекомбинантного бактериофага M13. Полученная система позволяет достоверно определять до 10 нг HВсAg в образцах сыворотки, что примерно в 10 000 раз более чувствительно, чем в ИФА [30].

Обнаружение антигена Р24 ВИЧ-1 позволяет диагностировать заболевание на ранней стадии. Р24 циркулирует в крови и/или секвенируется в иммунных комп-

лексах и тканях в отсутствие вирионов. Максимальная чувствительность ПЦР с обратной транскрипцией составляет 50 копий вирусной РНК на 1 мл. Barletta J. et al. разработали И-ПЦР в реальном времени для обнаружения антигена Р24, позволяющему определять 20 вирионов в 1 мл. Позднее Barletta J. et al. (2009) модифицировали свой метод, используя магнитные гранулы, который имел предел обнаружения 10-100 молекул антигена Р24, что соответствует менее одному вириону на мл, что имеет не только академический интерес, но также применимо при изучении патогенеза ВИЧ и сроков назначения антиретровирусной терапии [6].

Ротавирусная инфекция является наиболее частой причиной диареи у детей. Для этого заболевания свойственно острое начало, умеренно выраженные симптомы гастроэнтерита или энтерита, частое сочетание кишечного и респираторного синдромов в начальном периоде болезни. Количественный И-ПЦР анализ был разработан Adler M. et al. для раннего выявления ротавирусного антигена VP6. Однако чувствительность И-ПЦР оказалась аналогичной пределу обнаружения ротавирусных частиц в ОТ-ПЦР, описанной ранее — 100 вирусных частиц/мл. Вероятно, отсутствие повышения чувствительности является следствием использования разных образцов для анализа: в случае И-ПЦР — образцы кала, ОТ-ПЦР — пробы воды [4].

Норовирусы (NV) вместе с ротавирусами являются основной причиной развития кишечных инфекций у детей, всего 10-100 частиц вируса достаточно для заражения человека. Чувствительный И-ПЦР в реальном времени был разработан Tian P. и Mandrell R. для обнаружения белка капсида NV в образцах кала и пищи с пределом обнаружения 100 очищенных вирусоподобных частиц, что оказалась в 10 раз выше, чем в ПЦР [37].

Вирус гриппа относится к семейству ортомиксовирусов, которые разделяют на три серологические группы: А, В и С. Впервые в Гонконге (1997 г.) зарегистрирована вспышка вируса птичьего гриппа H5N1 (грипп типа А) у людей (18 заболевших, 6 летальных исходов). Поэтому быстрая идентификация вируса имеет важные клинические и эпидемиологические последствия. Deng M.J. et al. опубликовали данные о И-ПЦР анализе для обнаружения сверхнизкой концентрации вируса птичьего гриппа и болезни Ньюкасла в образцах аллантоидной жидкости яиц и в мазке из трахеи домашней птицы. Этот анализ мог обнаружить до  $10^{-4}$  50% яичной инфекционной дозы ( $EID_{50}$ ) в мл вируса птичьего гриппа, что, по меньшей мере, в  $10^2$  раз чувствительнее по сравнению с ОТ-ПЦР и в  $10^3$  по сравнению с ИФА [12]. Позднее эти же авторы разработали И-ПЦР анализ с использованием магнитных частиц в качестве адсорбционной поверхности с применением стрептавидина в качестве линкера между ДА и репортерной ДНК. Для обоих вирусов наблюдался предел обнаружения до  $10^{-4} EID_{50}$  в мл, что может обеспечить массовый скрининг [13].

Таким образом, И-ПЦР является высокочувствительным и специфичным методом, превосходящим ИФА и ПЦР. Он может использоваться для обнаружения вирусных и бактериальных антигенов и антител в минимальном количестве, что позволяет использовать его для ранней диагностики заболеваний, когда возможно более успешное проведение антибактериальной терапии и специфического лечения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Козырь А.В., Колесников А.В., Хлынцева А.Е., Белова Е.В., Шемякин И.Г. Способ определения наличия протективного антигена сибирской язвы на основе иммунодетекции, сопряженной с полимеразной цепной реакцией. Патент на изобретение № 2470307, 20.12.2012.
2. Козырь А.В., Колесников А.В., Хлынцева А.Е., Белова Е.В., Шемякин И.Г. Способ определения летального фактора сибирской язвы на основе иммунодетекции, сопряженной с полимеразной цепной реакцией. Патент на изобретение № 2486524, 27.06.2013.

3. Adams N.M., Jackson S.R., Haselton F.R. et al. Design, synthesis, and characterization of nucleic-acid functionalized gold surfaces for biomarker detection. *J. Langmuir*. 2012, 28:1068-1082.
4. Adler M., Schulz S., Fisher R., Niemeyer C.M. Detection of Rotavirus from stool samples using a standardized immuno-PCR («Imperacer») method with endpoint and real-time detection. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005, 333:1289-1294.
5. Adler M., Wacker R., Niemeyer C.M. Sensitivity by combination: immuno-PCR and related technologies. *J. Analyst (London)*. 2008, 133:702-718.
6. Barletta J., Bartolome A., Constantine N.T. Immunomagnetic quantitative immuno-PCR for detection of less than one HIV-1 virion. *J. Virol. Methods*. 2009, 157:122-132.
7. Chang T.C., Huang S.H. A modified immuno-polymerase chain reaction for the detection of  $\beta$ -glucuronidase from *Escherichia coli*. *J. Immunol. Methods*. 1997, 208:35-42.
8. Chao H.Y., Wang Y.C., Tang S. et al. A highly sensitive immuno-polymerase chain reaction assay for *Clostridium botulinum* neurotoxin type A. *J. Toxicon*. 2004, 43:27-34.
9. Chen L., Wei H., Guo Y. et al. Gold nanoparticle enhanced immuno-PCR for ultrasensitive detection of Hantaan virus nucleocapsid protein. *J. Immunol. Methods*. 2009, 346:64-70.
10. Chye S.M., Lin S.R., Chen Y.L. et al. Immuno-PCR for detection of antigen to *Angiostrongylus cantonensis* circulating fifth-stage worms. *Clin. Chem*. 2004, 50:51-57.
11. Cooper A., Williams N., Morris J. et al. ELISA and immuno-polymerase chain reaction assays for the sensitive detection of melioidosis. *J. Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. 2013, 75:135-138.
12. Deng M.J., Xiao X.Z., Zhang Y.M. et al. A highly sensitive immuno-PCR assay for detection of H5N1 avian influenza virus. *Mol. Biol. Rep*. 2011, 38:1941-1948.
13. Deng M., Long L., Xiao X. et al. Immuno-PCR for one step detection of H5N1 avian influenza virus and Newcastle disease virus using magnetic gold particles as carriers. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 2011, 141:183-189.
14. Fischer A., von Eiff C., Kuczius T. et al. A quantitative real-time immuno-PCR approach for detection of staphylococcal enterotoxins. *J. Mol. Med*. 2007, 85:461-469.
15. Guo Y. C., Zhou Y. F., Zhang X. E. et al. Phage display mediated immuno-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2006, 34, e62.
16. He X., McMahon S., Skinner C. et al. Development and characterization of monoclonal antibodies against Shiga toxin 2 and their application for toxin detection in milk. *J. Immunol. Methods*. 2013, 389:18-28.
17. Huang S.H., Chang T.C. Detection of *Staphylococcus aureus* by a sensitive immuno-PCR assay. *Clin. Chem*. 2004, 50:1673-1674.
18. Kingston J., Saugata M., Uppalapati S.R. et al. Anthrax Outbreak Among Cattle and its Detection by Extractable Antigen 1 (EA1) Based Sandwich ELISA and Immuno PCR. *Indian J. Microbiol*. 2015, 55(1):29-34.
19. Kolesnikov A.V., Kozyr A.V., Ryabko A.K., Shemyakin I.G. Ultrasensitive detection of protease activity of anthrax and botulinum toxins by a new PCR-based assay. *FEMS Pathog. Dis*. 2016, 74:1-10.
20. Liang H., Cordova S.E., Kieft T.L. et al. A highly sensitive immuno-PCR assay for detecting Group A *Streptococcus*. *J. Immunol. Methods*. 2003, 279:101-110.
21. Liu X., Xu Y., Xiong Y. et al. VHH phage-based competitive real time immuno-polymerase chain reaction for ultrasensitive detection of ochra toxin A in cereal. *Anal. Chem*. 2014, 86:7471-7477.
22. Luk C., Compta Y., Magdalinou N. et al. Development and assessment of sensitive immuno-PCR assays for the quantification of cerebrospinal fluid three- and four-repeat tau isoforms in tauopathies. *J. Neurochem*. 2012, 123:396-405.
23. Maerle A.V., Ryazantsev D.Y., Dmitrenko O.A., Petrova E.E., Komaleva R.L., Sergeeva I.V., Trofimov D.Yu., Zavriev S.K. Detection of *Staphylococcus aureus* Toxins Using Immuno-PCR. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2014, 40:526-531.
24. Maia M., Takahashi H., Adler K. et al. Development of a two-site immuno-PCR assay for hepatitis B surface antigen. *J. Virol. Methods*. 1995, 52:273-286.
25. Makam S., Majumder S., Kingston J. et al. Immuno capture PCR for rapid and sensitive identification of pathogenic *Bacillus anthracis*. *World J. Microbiol. Biotechnol*. 2013, 29(12):2379-2388.
26. Malou N., Raoult D. Immuno-PCR: a promising ultrasensitive diagnostic method to detect antigens and antibodies. *Trends Microbiol*. 2011, 19:295-302.
27. Malou N., Tran T.N., Nappes C. et al. Immuno-PCR — a new tool for paleomicrobiology: the plague paradigm. *PLoS ONE*. 2012, 7, e31744.

28. Mehta P.K., Kalra M., Khuller G.K. et al. Development of an ultrasensitive polymerase chain reaction-amplified immunoassay based on mycobacterial RD antigens: implications for the serodiagnosis of tuberculosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2012, 72:166-174.
29. Mehta P.K., Raj A., Singh N. et al. Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2012, 66: 20-36.
30. Monjezi R., Tan S.W., Tey B.T. et al. Detection of hepatitis B virus core antigen by phage display mediated TaqMan real-time immuno-PCR. *J. Virol. Methods.* 2013, 187:121-126.
31. Morin I., Askin S.P., Schaeffer P.M. IgG-detection devices for the Tus-Ter-lock immuno-PCR diagnostic platform. *J. Analyst.* 2011, 136:4815-4821.
32. Niemeyer C.M., Adler M., Wacker R. Detecting antigens by quantitative immuno-PCR. *Nat. Protoc.* 2007, 2:1918-1930.
33. Niemeyer C.M., Adler M., Pignataro B. et al. Selfassembly of DNA-streptavidin nanostructures and their use as reagents in immuno-PCR. *Nucleic Acids Res.* 1999, 27:4553-4561.
34. Perez J.W., Vargis E.A., Russ P.K. et al. Detection of respiratory syncytial virus using nanoparticle amplified immuno-polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 2011, 410:141-148.
35. Rajkovic A., Moulaj B., Uyttendaele M. et al. Immunoquantitative real-time PCR for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72:6593-6599.
36. Ryazantsev D.Y., Petrova E.E., Kalinina N.A., Valyakina T.I., Grishin E.V., Zavriev S.K. Application of supramolecular DNA streptavidin complexes for ultrasensitive detection of several toxins by immuno-PCR. *Global J. Analytical Chemistry.* 2012, 3:e17.
37. Tian P., Mandrell R. Detection of norovirus capsid proteins in faecal and food samples by a real time immuno-PCR method. *J. Appl. Microbiol.* 2006, 100:564-574.
38. Wu H.C., Huang Y.L., Lai S.C. et al. Detection of *Clostridium botulinum* neurotoxin type A using immunoPCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 2001, 32:321-325.
39. Zhang W., Bielaszewska M., Pulz M. et al. New immuno-PCR assay for detection of low concentrations of Shiga toxin 2 and its variants. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 46:1292-1297.

*Поступила 27.07.18*

Контактная информация: Баркова Ирина Анатольевна, к.м.н.,  
400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. р.т. (8442) 37-37-74

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*Ю.Н.Тараканова<sup>1</sup>, А.Д.Дмитриев<sup>1</sup>, Д.А.Дмитриев<sup>1</sup>, В.Ф.Лавров<sup>1,2</sup>, Ю.С.Массино<sup>1</sup>, А.А.Печелюшко<sup>1</sup>, О.Л.Сезал<sup>1</sup>*

## **ТВЕРДОФАЗНЫЙ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ: ИСТОРИЯ, ТЕОРИЯ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ**

<sup>1</sup>НИИ вакцин и сывороток имени И.И.Мечникова, <sup>2</sup>Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва

Иммуноферментный твердофазный анализ (ИФА) играет значительную роль в развитии ряда важных направлений биологии и медицины, в том числе для диагностики опасных инфекций. В настоящем обзоре освещается история изобретения твердофазного ИФА, его дальнейшее усовершенствование и применение. Особый акцент сделан на факторах, влияющих на взаимодействие между антителами и антигенами на твердой фазе и их использовании для увеличения аналитической чувствительности твердофазного ИФА, включая сэндвич-метод определения антигенов.

*Журн. микробиол., 2019, № 3, С. 117—125*

Ключевые слова: иммуноферментный твердофазный анализ, аналитическая чувствительность, моноклональные антитела, аффинность, авидность, сэндвич-метод