

ПЦР-амплифицированный иммуноанализ (иммуно-ПЦР): принцип метода, варианты исполнения, возможности и перспективы использования для выявления патогенных биологических агентов

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021
УДК 579.61
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2021-5-4-366-375>

А.С. Горшков¹, Д.В. Печенкин¹, А.В. Кузнецовский¹, В.А. Балакин²

¹Филиал федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, 610000, Российская Федерация, г. Киров, Октябрьский проспект, д. 119

2724 военное представительство Министерства обороны Российской Федерации, 610025, Российская Федерация, г. Киров, ул. Мельничная, д. 31

Поступила 24.04.2021 г. Исправленный вариант 25.11.2021 г. Принята к публикации 20.12.2021 г. «Золотым стандартом» выявления биологических патогенов на сегодняшний день являются иммуноферментный анализ и полимеразная цепная реакция. Объединить оба метода в единую платформу, сохранить их преимущества, добиться высокой чувствительности анализа позволяет метод амплифицированного иммуноанализа – иммуно-ПЦР. Цель работы – рассмотреть возможности и перспективы использования ПЦР-амплифицированного иммуноанализа для выявления патогенных биологических агентов. Иммуно-ПЦР позволяет обнаруживать различные антигенные детерминанты ненуклеиновой природы в ПЦР за счет амплификации ДНК-метки, конъюгированной со специфическим антителом. Регистрация результата при этом также возможна в режиме реального времени по аналогии с тест-системами «real time» ПЦР. Основными методическими вопросами в технологии иммуно-ПЦР являются: выбор носителя комплексов биомолекул, выбор метода конъюгации антител детекции и репортерной нуклеиновой кислоты, оптимизация способов амплификации сигнальной ДНК и учета результатов, разработка способов снижения фоновых показателей. Мы считаем целесообразным проведение научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ по разработке и созданию диагностических наборов реагентов на основе иммуно-ПЦР. Применительно к задаче обнаружения малых и следовых количеств антигенов патогенных биологических агентов, наиболее вероятной диагностической «нишей» метода иммуно-ПЦР будет выявление токсинов микробного и немикробного происхождения, минимальная клинически значимая доза для которых меньше чувствительности соответствующих иммунохимических тест-систем. С учетом перспектив развития метода, в будущем возможна разработка таких тест-систем для выявления аналитов-гаптен, например некоторых токсикантов небиологического происхождения.

Ключевые слова: антитела; биотерроризм; ботулинический токсин; ДНК-метка; иммуно-ПЦР; патогенный биологический агент; рицин; тест-система; токсин.

Библиографическое описание: Горшков А.С., Печенкин Д.В., Кузнецовский А.В., Балакин В.А. ПЦР-амплифицированный иммуноанализ (иммуно-ПЦР): принцип метода, варианты исполнения, возможности и перспективы использования для выявления патогенных биологических агентов // Вестник войск РХБ защиты. 2021. Т. 5. № 4. С. 366–375. <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2021-5-4-366-375>

Арсенал современной лабораторной диагностики насчитывает более 5000 лабораторных

тестов для исследования клинически важных компонентов биологических жидкостей и тка-

ней. Для многих из них предложено по несколько десятков вариантов лабораторных методов, основанных на различных принципах определения патогенного агента [1]. В то же время для бактериологии и вирусологии разработка новых средств и способов выявления целевых анализов остается актуальной задачей ввиду генетической, антигенной изменчивости и постоянных эволюционных изменений микроорганизмов, происходящих в ходе эпидемических и инфекционных процессов; а также появления ранее неизвестных возбудителей инфекционных заболеваний. «Золотым стандартом» выявления патогенных биологических агентов на сегодняшний день являются иммуоферментный анализ (ИФА) и полимеразная цепная реакция (ПЦР). Различные вариации ИФА применяются для индикации анализов ненуклеиновой природы (антигенные детерминанты тест-систем – компоненты клеточной стенки микроорганизмов, экзо- и эндотоксины и др.), но зачастую диагностическая полезность иммуоферментных тест-систем нивелируется чувствительностью метода. В пересчете на концентрацию микробных клеток в среднем чувствительность ИФА находится в диапазоне 10^5 – 10^6 м.к./мл, что в пересчете на чистый антиген соответствует диапазону «наногаммы – десятки наногамм». Такая чувствительность в большинстве случаев является приемлемой, за исключением индикации токсинов с небольшими значениями LD_{50} – ботулинических токсинов, шига- и шигаподобных токсинов.

Метод ПЦР по своей чувствительности превосходит ИФА. Так, в пересчете на концентрацию микробных клеток его чувствительность находится в диапазоне 10^3 – 10^4 м.к./мл, но данный метод применим только тогда, когда определяемым анализом являются нуклеиновые кислоты, и он неприменим для детекции антигенных компонентов ПБА ненуклеиновой природы. Объединить методы ПЦР и ИФА в единую платформу, сохранив преимущества обоих методов, добиться высокой чувствительности при индикации антигенных детерминант патогенных биологических агентов (ПБА)¹ позволяет метод амплифицированного иммуноанализа (иммуно-ПЦР). Так называемая иммуно-ПЦР позволяет обнаруживать различные антигены в ПЦР за счет амплификации ДНК-метки, конъюгированной со специфическим антителом. Регистрация результата при этом также возможна в режиме реального времени по аналогии с ПЦР-РВ тест-системами [2, 3].

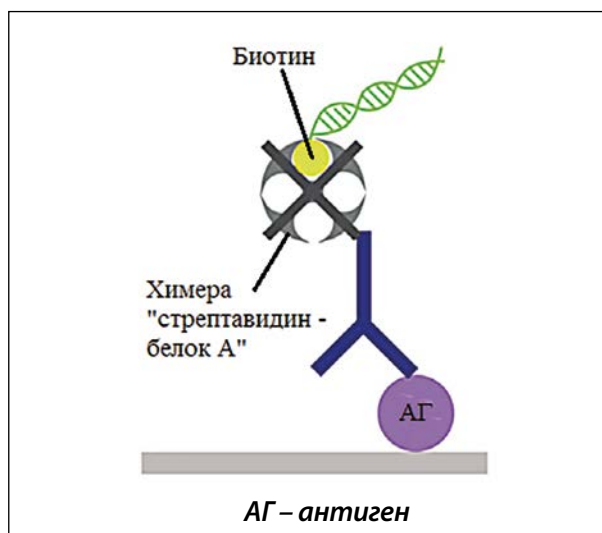


Рисунок 1 – Схематическое изображение метода иммуно-ПЦР, предложенного T. Sano и соавт. Приводится по L. Chang с соавт. [3]

Цель работы – рассмотреть возможности и перспективы использования ПЦР-амплифицированного иммуноанализа для выявления патогенных биологических агентов.

Данный метод был впервые описан T. Sano и соавт. в 1992 г. Идея метода заключалась в том, чтобы для детекции комплекса «антиген-антитело» использовать не ферментативный конъюгат, а репортерную ДНК [4]. Для апробации в качестве определяемого вещества был выбран бычий сывороточный альбумин. Вместо детектирующего иммуопероксидазного конъюгата авторы использовали биотинилированную плазмиду pUC19. Посредником между первичным антителом и репортерной плазмидой был выбран химерный белок «стрептавидин-белок А». Как известно, белки авидинового ряда (авидин, стрептавидин, нейтравидин) имеют большое сродство к биотину, а стафилококковый протеин А – высокое сродство к Fc-фрагменту иммуноглобулинов класса G. Таким образом, химерный белок одним сайтом (протеин А) связывался с антителом, другим сайтом (стрептавидиновым) – с биотином плазмиды pUC19 (рисунок 1).

После всех стадий инкубации образовавшийся комплекс разрушали, высвобождали целевую ДНК и проводили ПЦР с праймерами, специфичными к участкам плазмиды pUC 19. Результаты проведенных испытаний показали высокую чувствительность детекции модельного антигена (альбумин) – до 580 молекул анти-

¹ Патогенные биологические агенты – патогенные для человека микроорганизмы (бактерии, вирусы, хламидии, риккетсии, простейшие, грибы, микоплазмы), генно-инженерно-модифицированные микроорганизмы, яды биологического происхождения (токсины), гельминты, а также материал (включая кровь, другие биологические жидкости и экскреты организма), подозрительный на содержание перечисленных агентов.

гена в пробе, что в 10^5 раз превысило чувствительность классического твердофазного ИФА.

С момента разработки метод иммуно-ПЦР был усовершенствован по многим параметрам. Ключевыми направлениями эволюции этого метода являются [2, 3]:

- выбор носителя комплексов биомолекул;
- оптимизация способов конъюгации антител и ДНК-метки;
- оптимизация способов амплификации сигнальной ДНК и учета результатов;
- разработка способов снижения фоновых показателей.

Выбор носителя комплексов биомолекул.

Этот этап крайне важен для иммуно-ПЦР, поскольку от сорбционных характеристик материала зависит результативность сорбции целевых молекул, а от теплопроводности материала реакционной емкости (планшета, пробирки) – качество амплификации целевого участка нуклеиновой кислоты. В настоящее время существует два принципиальных подхода при амплификации сигнальной ДНК.

Первый заключается в осуществлении всего процесса в «одной лунке», *второй* – в отщеплении ДНК-метки от иммунного комплекса и перенос ее в пробирку для ПЦР. Первый подход требует тщательного подбора материала планшета, поскольку он должен не только эффективно связывать антитело или антиген для осуществления этапа образования комплекса «антиген-антитело», но также быть термостабильным, теплопроводным и подходить для проведения этапа амплификации. Первоначально для иммуно-ПЦР исследователи пытались использовать полипропиленовые микропланшеты, предназначенные для проведения ПЦР, но они не обеспечивали необходимой степени сорбции антигена [2]. Позднее в коммерческом доступе появились поликарбонатные 8-луночные стрипы Nunc™ TopYield™ Strips с улучшенной протеинсвязывающей способностью, разработанные специально для иммуно-ПЦР². Тем не менее данный продукт не лишен недостатков, многие исследователи отмечают низкую чувствительность анализа, а также плохой контакт материала планшетов с тепловым блоком амплификаторов³.

Второй подход может быть реализован с использованием термического или ферментативного метода (например, рестриктаз). Для этого в ДНК-метку заранее вводятся сайты рестрикции, по которым происходит отрезание части ДНК от сформированного комплекса. Возможно также использование нагрева проб

до температуры 95–100 °С, при котором комплекс «антитело-ДНК» самостоятельно денатурирует и ДНК-метка высвобождается. Недостатком данного подхода является повышение риска перекрестной контаминации образцов во время переноса реакционной смеси в новые микропробирки.

Оптимизация способов конъюгации антител и ДНК-метки. В настоящее время известны несколько методических подходов к созданию репортерных систем: биотинилирование лигандов (универсальный иммуно-ПЦР), прямая ковалентная сшивка ДНК и антител, использование технологии фагового дисплея, наночастиц [5], аптамеров [6], Tus-Ter-lock взаимодействия [7, 8] и др. (рисунок 2).

Наиболее распространенным и универсальным подходом является использование биотиновой системы конъюгирования, предложенной Н. Zhou с соавт. [9]. Разработчики этого метода отказались от использования химерного белка «стрептавидин-белок А», предложенного Т. Sano, и стали использовать биотинилированные антитела для детекции (в описанном Н. Zhou с соавт. варианте – для обнаружения рекомбинантного человеческого протоонкогена ETS1). В таком исполнении молекула стрептавидаина одним сайтом связывала биотинилированное антитело, другим сайтом – биотинилированную ДНК-метку (рисунок 2А). Ввиду относительной простоты исполнения метода биотинилирования биомолекул, доступности реагентов для проведения данной процедуры, возможности варьировать соотношения компонентов реакции, данный вариант конъюгации антител захвата и репортерной нуклеиновой кислоты, как наиболее удобный, получил широкое распространение среди разработчиков иммуно-ПЦР тест-систем.

Ковалентная сшивка антител детекции и репортерной нуклеиновой кислоты (рисунок 2Б) также является распространенным методом конъюгации, поскольку в настоящее время в коммерческом доступе имеются кросслинкеры и готовые наборы реагентов для проведения данной процедуры.

Фаговый дисплей также может быть применен к технологии иммуно-ПЦР. Как известно, с использованием технологии фагового дисплея, антиген-связывающие участки антител, например F_{ab} -фрагменты или изолированно переменные участки тяжелых цепей (V_H), могут быть представлены на поверхности фаговых частиц. При этом дополнительных работ по присоединению репортерной нуклеиновой

² URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/248909#/248909> (дата обращения: 10.07.2021).

³ URL: https://www.researchgate.net/post/Plate_choice_for_immuno-PCR (дата обращения: 10.07.2021).

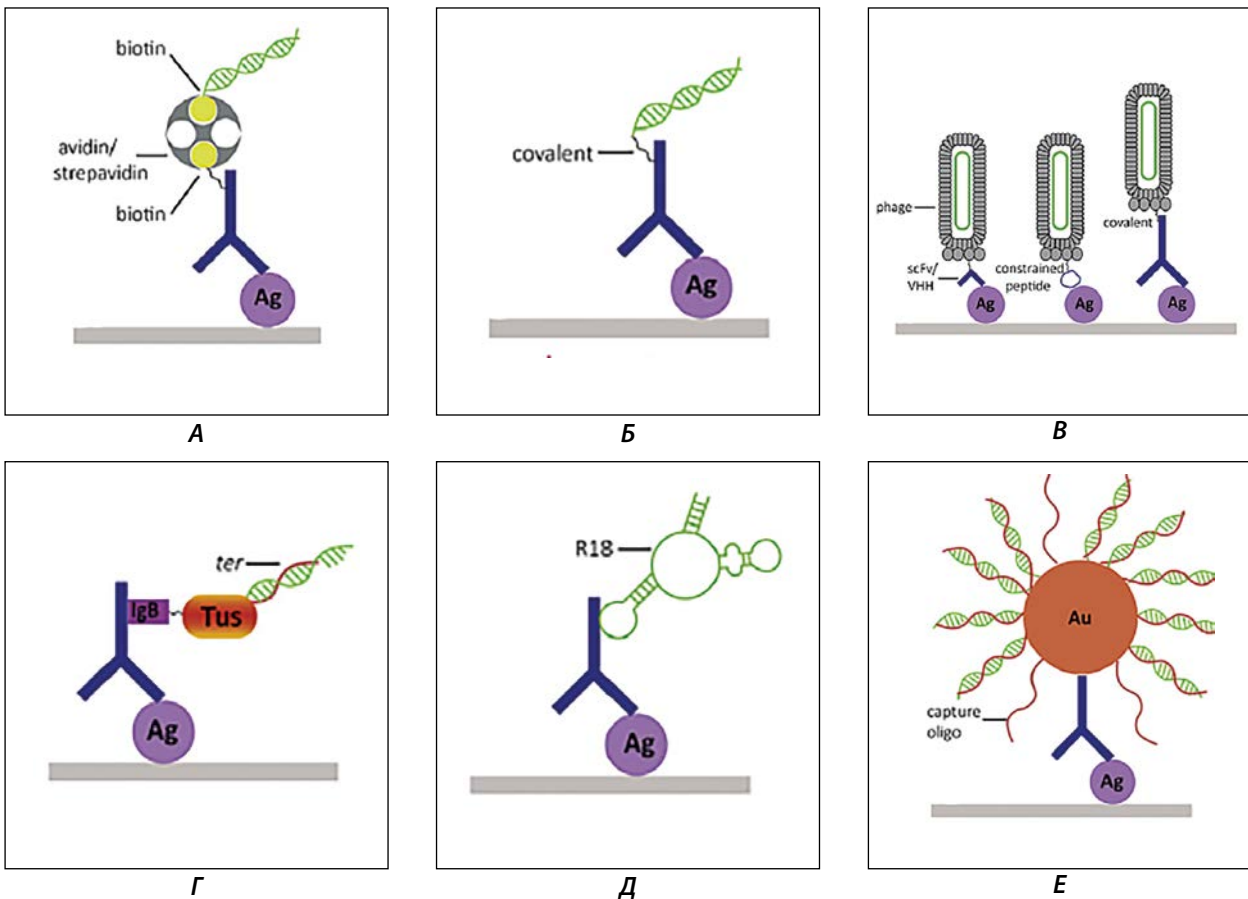


Рисунок 2 – Схематическое изображение вариантов конструирования репортерной системы для иммуно-ПЦР. А – «универсальный» вариант; Б – ковалентное связывание; В – фаговый дисплей; Г – Tus-Ter-lock взаимодействие; Д – аптамеры; Е – наночастицы. Приводится по работе L. Chang с соавт. [3]

кислоты не требуется, поскольку ее роль выполняет нуклеиновая кислота фага (рисунок 2В).

Взаимодействие Tus-Ter-lock по силе специфичности взаимодействия представляет собой альтернативу взаимодействию пары «антиген-антитело». При изучении молекулярно-генетических особенностей репликации прокариот оказалось, что в процесс терминации репликации у *Escherichia coli* вовлечен мономерный ДНК-связывающий белок Tus. Данный белок способен образовывать стабильный комплекс с терминаторным сайтом *ter* в геноме *E. coli* и тем самым блокировать действие геликазы в репликативной вилке [10]. Константа диссоциации комплекса Tus-Ter составляет порядка $3,4 \times 10^{-13}$ М [11]. Для использования в технологии иммуно-ПЦР, как правило, получают химерный белок – протеин Tus, слитый с иммуноглобулин-связывающим доменом – например, протеином G или L (на рисунке 3Г обозначен как IgB, от англ. «immunoglobulin binding»). Такой химерный белок одним сайтом связывается с антителами детекции, другим – с последовательностью *ter*, введенной в ДНК-метку – например, плазмиду.

Аптамеры – небольшие синтетические участки нуклеиновых кислот (ДНК или РНК), обладающие высоким сродством к целевым последовательностям биологических молекул, которое не уступает по аффинности взаимодействию «антиген-антитело». К настоящему моменту получено большое количество аптамеров к самым разным мишеням – начиная от простых неорганических молекул, и заканчивая сложными белковыми комплексами и целыми клетками. По сути, аптамеры представляют собой нуклеотидные аналоги антител [12]. Оказалось, что за счет наличия петель, дуплексов и шпилек нуклеиновые кислоты могут образовывать пространственные структуры, обладающие способностью специфично узнавать соответствующие им пространственные структуры других биомолекул, например, белков, за счет взаимодействия по типу «ключ-замок».

Для создания аптамеров применяются модифицированные нуклеотиды, благодаря чему аптамеры становятся устойчивы к действию рестриктаз. Константа диссоциации комплекса «аптамер-мишень» находится обычно в наномолярном диапазоне [14]. Ограничивающим

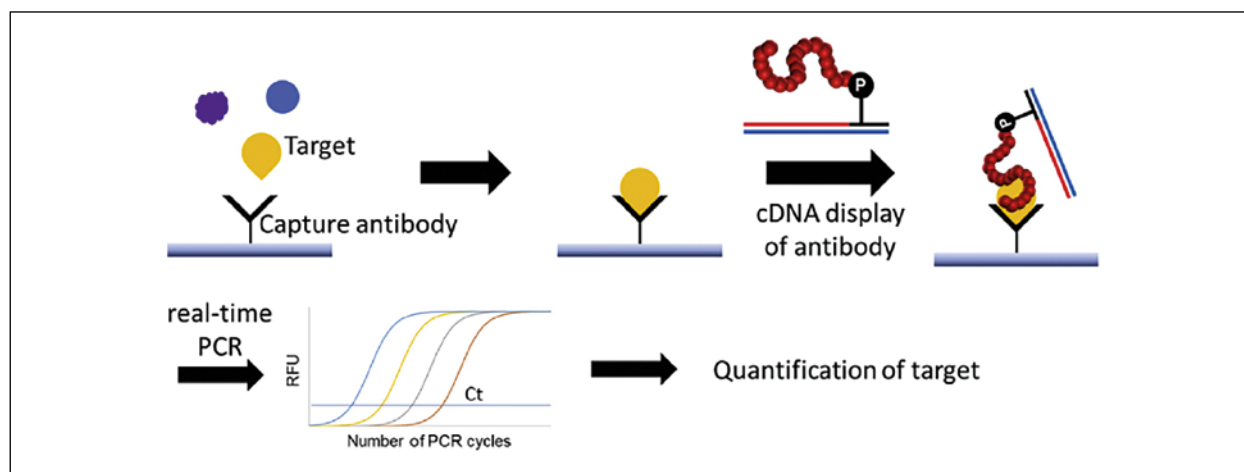


Рисунок 4 – Использование кДНК-дисплея в технологии иммуно-ПЦР. Target – мишень (определяемое вещество); Capture antibody – антитела захвата; cDNA display of antibody – кДНК-дисплей антител; P – пурамициновый линкер; real time PCR – ПЦР в режиме реального времени; Quantification of target – количественное определение мишени (определяемого вещества). Приводится по Н. Anzai с соавт. [15]

фактором использования аптамеров до некоторого времени была невозможность даже *in silico* спрогнозировать необходимую структуру специфических аптамеров для белков со сложной третичной структурой.

Метод отбора аптамеров, применяемый в настоящее время, получил название SELEX (от англ. systematic evolution of ligands by exponential enrichment – систематическая эволюция лигандов при экспоненциальном обогащении). Первоначально создается произвольная многовариантная (порядка 10^{15} вариантов) библиотека олигонуклеотидов, которые способны к образованию вторичных структур в виде петель и шпильек, а следующим этапом работы будет поиск в ней набора целевых олигонуклеотидов. При нанесении одновременно большого количества вариантов олигонуклеотидов на иммобилизованные на нитроцеллюлозной подложке антитела часть аптамеров, имеющих сродство к этим антителам, связываются с ними. Несвязанные нуклеиновые кислоты удаляются серией отмывок, а связанные амплифицируются. Такой цикл сорбции-отмывки-амплификации повторяют несколько раз, что позволяет в итоге получить несколько высокоспецифичных вариантов, пригодных для работы. Несомненно, что использование аптамеров в технологии иммуно-ПЦР является весьма удобным, поскольку это позволяет отказаться от введения «посредников» между антителом детекции и репортерной ДНК (рисунок 2Д). Тем не менее, данная технология не получила широкого распространения ввиду сложности создания аптамеров, хотя такие молекулы ввиду своих свойств не уступают моноклональным антителам и в будущем, вероятно, могут быть использованы вместо них во многих отраслях лабораторной диагностики.

Наночастицы металлов, например, золота, также могут быть посредником между антителом захвата и репортерной нуклеиновой кислотой. В настоящее время, в том числе за счет активного развития методов иммунохроматографии, технология создания конъюгатов антител и наночастиц коллоидного золота достаточно отработана, и в коммерческом доступе имеются все необходимые реагенты для проведения данной процедуры. Технология адсорбции нуклеиновых кислот на наночастицы металлов также не отличается сложностью и позволяет адсорбировать на одну наночастицу золота большое количество репортерной ДНК, что повышает чувствительность метода в целом (рисунок 2Е).

Сравнительно недавно были опубликованы результаты исследования, в котором было заявлено об открытии нового варианта иммуно-ПЦР, основанном на использовании дисплея кДНК [15]. Принцип создания кДНК-дисплея основан на способности пурамицина, связанного с небольшим олигонуклеотидным линкером, останавливать трансляцию полипептидной цепи и сшивать ее с молекулой мРНК. С использованием реакции обратной транскрипции на матрице мРНК строится цепь кодирующей ДНК (кДНК). Таким образом получается продукт-гибрид кДНК и ее белкового продукта. При использовании кДНК-дисплея антител (или их антиген-связывающих фрагментов) к определяемому белку такая конструкция подходит для использования в иммуно-ПЦР в качестве детектирующего комплекса (рисунок 3).

Оптимизация способов амплификации сигнальной ДНК и учета результатов. Возможно использование классического геле-

электрофореза амплифицированных участков и учета результатов в режиме реального времени. В большинстве опубликованных работ предпочтение отдается варианту «real-time», поскольку исключение этапа электрофореза позволяет существенно сократить время исследования, минимизировать контаминацию, оценить количество исходной матрицы и, как следствие, количество определяемого аналита [2]. Несомненно, что вариант «real-time» в сравнении с классическим гелевым методом детекции продуктов амплификации является более технологичным, что обуславливает именно его выбор при разработке новых иммуно-ПЦР тест-систем.

Для снижения фонового сигнала в технологии иммуно-ПЦР применяются различные блокирующие реагенты для покрытия свободных поверхностей планшета, аналогичные блокирующим реагентам, применяемым в классическом ИФА. Широкое распространение получили бычий сывороточный альбумин, казеин, обезжиренное молоко, ДНК из молок лосося [9] или тимуса телят [2].

В настоящее время метод иммуно-ПЦР активно применяется за рубежом как метод выявления антигенных аналитов, присутствующих в биологических образцах в малых количествах – например, для обнаружения следовых количеств аутоантител при аутоиммунных заболеваниях [16], ростовых факторов [17], а также лекарственных препаратов (допинг-пробы) [18]. Данный метод применяется и для выявления патогенных биологических агентов, особенно в тех случаях, когда классические бактериологические и/или серологические методы выявления микроорганизмов оказываются недостаточно чувствительны. В клинике такая ситуация крайне актуальна в отношении возбудителя туберкулеза, поэтому значительное количество опубликованных результатов исследований по выявлению микробных антигенов, проведенных с применением метода иммуно-ПЦР, касается именно серодиагностики туберкулеза. Большинство публикаций по данной тематике принадлежит авторам из развивающихся стран, в частности, Индии, где туберкулез является острой медицинской и социальной проблемой ввиду климатических и социально-экономических условий проживания населения.

По данным Р.К. Mehta с соавт. [19], при использовании иммуно-ПЦР для детекции различных антигенных детерминант микробактерий туберкулеза в образцах мокроты пациентов чувствительность метода иммуно-ПЦР на 20-30 % превышает чувствительность классическо-

го ИФА. Несомненно, что данный метод нашел свое применение не только для первичной диагностики туберкулеза, но и для оценки ответа на проводимую антибактериальную терапию, особенно при одновременной количественной оценке нескольких антигенных маркеров [20].

Ввиду очевидных достоинств, применение метода иммуно-ПЦР для выявления ряда возбудителей инфекционных заболеваний постоянно расширяется. Одной из потенциальных «ниш» метода иммуно-ПЦР можно считать выявление в биологических образцах токсинов, поскольку количество токсина, необходимое для развития клинически значимого эффекта, часто бывает меньше порога чувствительности традиционных серологических и иммунологических методов диагностики. Так, например, иммуно-ПЦР оказался применим для выявления стафилококковых энтеротоксинов [21], шига- и шигаподобных токсинов [22], ботулинического токсина [23], токсина *Clostridium perfringens* [24], микотоксинов [25], [26] и гербицида глифосфата в составе продуктов питания (соевые бобы) [27]. Иными словами, ниша иммуно-ПЦР как метода, по нашему мнению – это детекция малых и следовых количеств аналитов, обладающих антигенными свойствами.

Актуальной проблемой в настоящее время является разработка высокочувствительных средств диагностики такого токсина, как рицин. Технология его получения из касторовых бобов доступна для террористических организаций и криминальных сообществ. В частности, рицином пытались отравить президента США Д. Трампа, а сам рицин журналисты часто именуют «оружием дилетантов»⁴. Лабораторно-экспериментальный образец иммуно-ПЦР теста для выявления рицина был разработан и апробирован в 2010 г. группой исследователей из Калифорнии [28]. В данном исследовании было показано, что иммуно-ПЦР тест-система для обнаружения рицина, сконструированная по принципу «сэндвича», оказалась чувствительнее ИФА тест-системы в 10 раз при анализе контаминированных рицином образцов мясного фарша, в 100 раз – при анализе образцов молока и в 1000 раз – при анализе куриных яиц. При этом предпочтение было отдано двухэтапному протоколу проведения иммуно-ПЦР (с отщеплением и переносом ДНК-маркера в пробирку для проведения процедуры ПЦР). Усовершенствование теста за счет подбора пар антител (антитела подложки и детектирующего антитела) позволило дополнительно увеличить чувствительность разработанного набора реагентов до 10 фг/мл.

⁴ Рицин для Трампа. В США задержана подозреваемая в отправке яда в Белый дом. URL: <https://www.bbc.com/russian/news-54232938> (дата обращения: 10.07.2021).

Несмотря на высокую аналитическую чувствительность метода иммуно-ПЦР, широкий диапазон диагностического применения (от гербицидов и токсинов до аутоантител), относительную проработанность приборной и реагентной базы, его коммерциализация на сегодняшний день гораздо слабее рынка тест-систем, основанных на «родоначальных» методах детекции – ПЦР и ИФА. Если тест-системы на основе методов ПЦР и ИФА разрабатывают сотни фирм-производителей по всему миру, то наборы реагентов для иммуно-ПЦР пока еще редки в свободном доступе и существуют в основном в виде лабораторно-экспериментальных образцов.

Так, фирма RayBiotech занимается выпуском готовых наборов реагентов для иммуно-ПЦР (представлены наборы для обнаружения различных антигенных маркеров человека и животных – онкомаркеров, интерлейкинов, факторов транскрипции и др) под коммерческим брендом IQELISA™ Kits⁵. Фирма Abcam (один из «биотехнологических гигантов») пошла по другому варианту коммерциализации и продает не готовые к использованию тест-системы, а наборы реагентов для конъюгации антител и олигонуклеотидной метки, позволяющие создать собственный набор иммуно-ПЦР реагентов⁶. В аналогичном формате (наборы для самостоятельной конъюгации) представлена продукция фирмы BioRad⁷. Несомненно, что такой подход удобен производителям и потребителям реагентов для научных исследований, когда сконструированная тест-система представляет собой лабораторно-экспериментальный образец, не проходит процедуру сертификации и не используется как средство диагностики. С другой стороны, этот подход не устраивает специалистов практического звена, поскольку такие наборы реагентов обычно классифицируются как «not for clinical diagnostic» (не для клинической диагностики), и поэтому не могут быть сертифицированы на отечественном рынке как изделия медицинско-

го назначения, предназначенные для использования в клинической лабораторной практике.

Из отечественных зарегистрированных коммерческих иммуно-ПЦР тест-систем для выявления ПБА необходимо выделить: «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), «Набор реагентов для определения ботулинистического нейротоксина I типа А методом И-ПЦР» (РУ № РЗН 2014/1424), разработанные и внедренные в практику сотрудниками ФБУН ГНЦ ПМБ (п. Оболенск). Данные средства индикации реализованы на платформе универсальной иммуно-ПЦР. Чувствительность тест-систем оказалась очень высокой – например, предел обнаружения для ботулинического нейротоксина типа А составлял 100 фг [29].

Таким образом, с учетом очевидных преимуществ данного метода и малым объемом мирового и отечественного рынка иммуно-ПЦР тест-систем, мы считаем целесообразным проведение научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ по разработке и созданию диагностических наборов реагентов на основе ПЦР-амплифицированного иммуноанализа (иммуно-ПЦР). Применительно к задаче обнаружения малых и следовых количеств антигенов ПБА, наиболее вероятной диагностической «нишей» метода иммуно-ПЦР будет выявление токсинов микробного и немикробного происхождения, минимальная клинически значимая доза для которых меньше чувствительности соответствующих иммунохимических тест-систем. С учетом перспектив развития метода, в будущем возможна разработка таких тест-систем для выявления аналитов-гаптеннов – например, некоторых токсикантов небиологического происхождения.

⁵ URL: <https://www.raybiotech.com/products/elisa/raybio-iqelisa-kits/page-14/> (дата обращения: 10.07.2021).

⁶ URL: <https://www.abcam.com/oligonucleotide-conjugation-kit-ab218260.html> (дата обращения: 10.07.2021).

⁷ URL: <https://www.bio-rad.com/ru-ru/product/elisa-immuno-explorer-kit?ID=1e3f3100-99f6-49b3-b9a0-2c8aad9d285> (дата обращения: 10.07.2021).

Вклад авторов/ Autors Contribution

Все авторы внесли свой вклад в концепцию рукописи, участвовали в обсуждении и написании этой рукописи, одобрили окончательную версию. Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи / All authors contributed to the conception of the manuscript, the discussion, and writing of this manuscript, approved the final version. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Информация о конфликте интересов

Авторы заявляют, что исследования проводились при отсутствии любых коммерческих или финансо-

вых отношений, которые могли бы быть истолкованы как потенциальный конфликт интересов.

Сведения о рецензировании

Статья прошла открытое рецензирование двумя рецензентами, специалистами в данной области. Рецензии находятся в редакции журнала и в РИНЦе.

Список источников / References:

1. Кишкун А.А. Клиническая лабораторная диагностика: учебное пособие. 2-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. 832 с.
2. Kishkun A.A. Clinical laboratory diagnostics: textbook / 2nd ed., Rev. and add. М.: GEOTAR-Media, 2019. 832 p. (in Russian).
3. Рязанцев Д.Ю., Воронина Д.В., Завриев С.К. Иммуно-ПЦР: Достижения и перспективы // Успехи биологической химии. 2016. Т. 56. С. 377–410.
4. Ryazantsev D.Yu., Voronina D.V., Zavriev S.K. Immuno-PCR: Achievements and Prospects // Advances in Biological chemistry. 2016. V. 56. P. 377–410 (in Russian).
5. Chang L., Li J., Wang L. Immuno-PCR: An ultrasensitive immunoassay for biomolecular detection // Anal. Chim. Acta. 2016. V. 910. P. 12–24. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.12.039>
6. Sano T., Smith C.L., Cantor Ch.R. Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates // Science. 1992. V. 258. P. 120–122. <https://doi.org/10.1126/science.1439758>
7. 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. V. 141. № 3–4. P. 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.02.018>.
8. Кульбачинский А.В. Методы отбора аптамеров к белковым мишеням // Успехи биологической химии. 2006. Т. 46. С. 193–224.
9. Kulbachinsky A.V. Methods for the selection of aptamers for protein targets // Advances in Biological Chemistry. 2006. V. 46. P. 193–224 (in Russian).
10. Morin I., Askin S.P., Schaeffer P.M. IgG-detection devices for the Tus-Ter-lock immuno-PCR diagnostic platform // Analyst. 2011. V. 136. № 22. P. 4815–4821. <https://doi.org/10.1039/c1an15731k>
11. Johnston E.B., Kamath S.D., Lopata A.L. et al. Tus-Ter-lock immuno-PCR assays for the sensitive detection of tropomyosin-specific IgE antibodies // Bioanalysis. 2014. V. 6. № 4. P. 465–476. <https://doi.org/10.4155/bio.13.315>
12. Zhou H., Fisher R.J., Papas T.S. Universal immuno-PCR for ultra-sensitive target protein detection // Nucleic Acids Res. 1993. V. 21. P. 6038–6039. <https://doi.org/10.1093/nar/21.25.6038>
13. Neylon C., Kralicek A.V., Hill T. M., Dixon N.E. Replication termination in Escherichia coli: structure and antihelicase activity of the Tus-Ter complex // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2005. V. 69. № 3. P. 501–526. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.3.501-526.2005>
14. Gottlieb P.A., Wu S., Zhang X. et al. Equilibrium, kinetic, and footprinting studies of the Tus-Ter protein-DNA interaction // J. Biol Chem. 1992. V. 267. № 11. P. 7434–7443. <https://doi.org/10.3390/molecules24081572>
15. Лахин А.В., Тарантул В.З., Генинг Л.В. Аптамеры: проблемы, пути их решения и перспективы // Acta Naturae. 2013. Т. 5. № 4. С. 28–39
16. Lakhin A.V., Tarantul V.Z., Gening L.V. Aptamers: problems, ways of solving them and prospects // Acta Naturae. 2013. V. 5. № 4. P. 28–39 (in Russian).
17. Sullivan R., Adams M.C., Naik R.R., Milam V.T. Analyzing secondary structure patterns in DNA aptamers identified via CompELS // Molecules. 2019. V. 24. № 8. P. 1572. <https://doi.org/10.3390/molecules24081572>
18. Чумаков А.М., Юхина Е.С., Фролова Е.И. и др. Расширение возможностей применения ДНК-аптамеров путем их функционализации // Биоорганическая химия. 2016. Т. 42. № 1. С. 3–17.
19. Chumakov A.M., Yuhina E.S., Frolova E.I. et al. Expanding the possibilities of using DNA aptamers by their functionalization // Bioorganic chemistry. 2016. V. 42. № 1. P. 3–17 (in Russian).
20. Anzai H., Terai T., Jayathilake C. et al. A novel immuno-PCR method using cDNA display // Anal. Biochem. 2019. V. 578. P. 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.04.017>
21. Graner M., Pointon T., Manton S. et al. Oligoclonal IgG antibodies in multiple sclerosis target patient-specific peptides // PLoS One. 2020. V. 15. № 2. e0228883. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228883>
22. Rezaei Z.S., Shahangian S.S., Hasannia S., Sajedi R.H. Development of a phage display-mediated immunoassay for the detection of vascular endothelial growth factor // Anal. Bioanal. Chem. 2020. V. 412. № 27. P. 7639–7648. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02901-4>
23. Zhao L., Zhou H., Sun T. et al. Complete antigen-bridged DNA strand displacement amplification immuno-PCR assay for ultrasensitive detection of salbutamol // Sci. Total Environ. 2020. V. 748. P. 142330. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142330>
24. Mehta P.K., Dahiya B., Sharma S. et al. Immuno-PCR, a new technique for the serodiagnosis of tuberculosis // J. Microbiol. Methods. 2017. V. 139. P. 218–229. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.05.009>
25. Sharma S., Sheoran A., Gupta K.B. et al. Quantitative detection of a cocktail of mycobacterial MPT64 and PstS1 in tuberculosis patients by real-time immuno-PCR // Future Microbiol. 2019. V. 14. P. 223–233. <https://doi.org/10.2217/fmb-2018-0284>
26. Маерле А.В., Рязанцев Д.Ю., Дмитренко О.А.

и др. Определение токсинов *Staphylococcus aureus* методом иммуно-ПЦР // Биоорганическая химия. 2014. Т. 40. № 5. С. 571.

Maerle A.V., Ryazantsev D.Yu., Dmitrenko O.A. et al. Determination of *Staphylococcus aureus* toxins by immuno-PCR // Bioorganic chemistry. 2014. V. 40. № 5. P. 571 (in Russian).

22. Kirchner M., Sayers E., Cawthraw S. et al. A sensitive method for the recovery of *Escherichia coli* serogroup O55 including Shiga toxin-producing variants for potential use in outbreaks // J. Appl. Microbiol. 2019. V. 127. № 3. P. 889–896. <https://doi.org/10.1111/jam.14345>

23. 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 // Pathog. Dis. 2016. V. 74. № 1. P.112. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv112>

24. Das S., Majumder S., Nag M., Kingston J.J. A sandwich duplex immuno PCR for rapid and sensitive identification of *Clostridium perfringens* alpha and enterotoxin // Anaerobe. 2019. V. 57. P. 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.03.015>

25. Ren X., Zhang Q., Wu W. et al. Anti-idiotypic nanobody-phage display-mediated real-time immuno-PCR for sensitive, simultaneous and quantitative

detection of total aflatoxins and zearalenone in grains // Food Chem. 2019. V. 297. P. 124912. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.186>

26. Huang W., Tu Z., Ning Z. et al. Development of real-time immuno-PCR based on phage displayed an anti-idiotypic nanobody for quantitative determination of citrinin in *monascus* // Toxins (Basel). 2019. V. 11. № 10. P. 572. <https://doi.org/10.3390/toxins11100572>

27. Guan N., Li Y., Yang H., Hu P. et al. Dual-functionalized gold nanoparticles probe based bio-barcode immuno-PCR for the detection of glyphosate // Food Chem. 2021. V. 338. P. 128133. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128133>

28. He X., McMahon S., McKeon T.A., Brandon D.L. Development of a novel immuno-PCR assay for detection of ricin in ground beef, liquid chicken egg, and milk // J. Food Prot. 2010. V. 73. № 4. P. 695–700. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-73.4.695>

29. Баркова И.А, Барков А.М., Викторов Д.Н. Метод иммуно-ПЦР в диагностике бактериальных и вирусных инфекций // Журн. микробиол. 2019. № 3. С. 110–117.

Barkova I.A., Barkov A.M., Viktorov D.N. The method of immuno-PCR in the diagnosis of bacterial and viral infections // J. Microbiol. 2019. № 3. P. 110–117 (in Russian).

Об авторах

Филиал федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, 610000, Российская Федерация, г. Киров, Октябрьский проспект, д. 119.

Горшков Антон Сергеевич. Научный сотрудник научно-исследовательского отдела, канд. мед. наук.

Печенкин Денис Валериевич. Начальник научно-исследовательского отдела, канд. мед. наук.

Кузнецовский Андрей Владимирович. Начальник отдела планирования НИР – заместитель начальника филиала по НИР, канд. биол. наук.

724 военное представительство Министерства обороны Российской Федерации, 610025, Российская Федерация, г. Киров, ул. Мельничная, д. 31.

Балакин Василий Альбертович. Инженер военного представительства.

Контактная информация для всех авторов: 23527@mil.ru

Контактное лицо: Печенкин Денис Валериевич: 23527@mil.ru

PCR-amplified Immunoassay (Immuno-PCR): Principle of the Method, Variants of Execution, Possibilities and Prospects of Use for the Detection of Pathogenic Biological Agents

A.S. Gorshkov¹, D.V. Pechenkin¹, A.V. Kuznetsovskiy¹, V.A. Balakin²

¹Branch Office of the Federal State Budgetary Establishment «48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of Defence of the Russian Federation, Oktyabrsky Avenue 119, Kirov 610000, Russian Federation

²724 Military Representation of the Ministry of Defence of the Russian Federation, Mel'nichnaya street, 31, Kirov 610025, Russian Federation

Received 24 April 2021. Corrected variant 25 November 2021.
Accepted for publication 20 December 2021.

Enzyme immunoassay and polymerase chain reaction have become the «gold standard» for the detection of biological pathogens. The method of amplified immunoassay – immuno-PCR allows to combine both methods into a single platform to preserve their advantages and to achieve high sensitivity of the analysis. The *purpose of this work* is to consider the possibilities and prospects of using PCR-amplified immunoassay for the detection of pathogenic biological agents. Immuno-PCR makes it possible to detect various non-nucleic antigenic determinants in PCR by amplifying a DNA tag conjugated with a specific antibody. The registration of the results is also possible in real time as in the real-time PCR test systems. The main methodological issues in the immuno-PCR technology are: the choice of a carrier of biomolecule complexes, the choice of a method for conjugation of detection antibodies and a reporter nucleic acid, optimization of methods for amplifying signal DNA and accounting for results, and development of methods for reducing background indicators. We consider it necessary to carry out research and development work on the development and the creation of diagnostic kits based on immuno-PCR. With regard to the task of detecting small and trace amounts of antigens of pathogenic biological agents, the most likely diagnostic «niche» of the immuno-PCR method will be the detection of toxins of microbial and non-microbial origin, the minimum clinically significant dose for which is less than the sensitivity of the corresponding immunochemical test systems. Taking into account the prospects for the development of the method, in future it is possible to develop such test systems for the detection of hapten analytes, for example, some toxicants of non-biological origin.

Keywords: antibodies; bioterrorism; botulinum toxin; DNA tag; immuno-PCR; pathogenic biological agent; ricin; test system; toxin.

For citation: Gorshkov A.S., Pechenkin D.V., Kuznetsovskiy A.V., Balakin V.A. *PPCR-amplified Immunoassay (Immuno-PCR): Principle of the Method, Variants of Execution, Possibilities and Prospects of Use for the Detection of Pathogenic Biological Agents // Journal of NBC Protection Corps. 2021. V. 5. № 4. С. 366–375. <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2021-5-4-366-375>*

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationship that could be construed as a potential conflict of interest.

Peer review information

The article has been peer reviewed by two experts in the respective field. Peer reviews are available from the Editorial Board.

References

See P. 373–374.

Authors

Branch Office of the Federal State Budgetary Establishment «48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of Defence of the Russian Federation, Oktyabrsky Avenue 119, Kirov 610000, Russian Federation.

Anton Sergeevich Gorshkov. Researcher of the Scientific and Research Department. Candidate of Medical Sciences.

Denis Valerievich Pechenkin. Chief of the Scientific and Research Department. Candidate of Medical Sciences.

Andrey Vladimirovich Kuznetsovskiy. Chief of the Department of Planning of Science and Research – Deputy Chief of the Branch. Candidate of Biological Sciences.

724 Military Representation of the Ministry of Defence of the Russian Federation, Mel'nichnaya street, 31, Kirov 610025, Russian Federation

Vasily Albertovich Balakin. Military Engineer

Contact information for all authors: 23527@mil.ru

Contact person: Denis Valeryevich Pechenkin; 23527@mil.ru