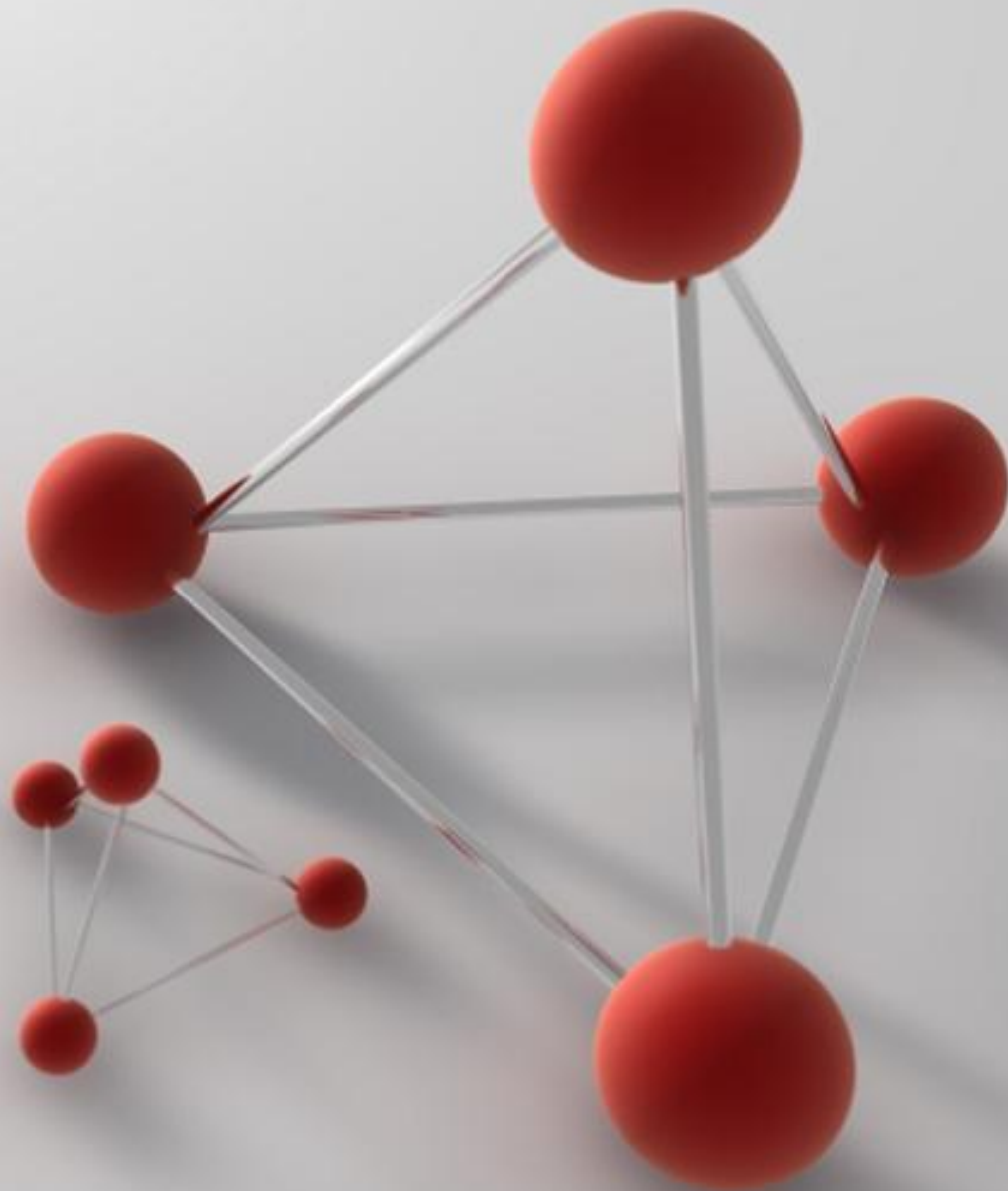
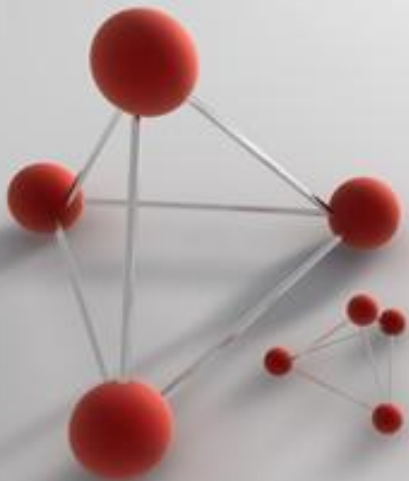


***Сравнение
результатов
ПЦР и ИФА.
Причины
расхождения
результатов.***



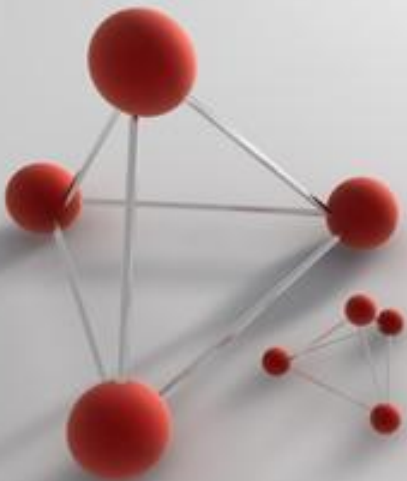
Бурный прогресс в области молекулярной биологии в последние десятилетия сопровождался возникновением новых методов исследования, основанных на использовании моноклональных антител, метода гибридизации на фильтрах и полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Эти методы нашли применение в медицине при диагностике различных заболеваний.



В результате сформировалась новая ветвь клинической лабораторной диагностики – молекулярная клиническая диагностика.

Молекулярная клиническая диагностика – это наука, осуществляющая диагностику болезней на молекулярном уровне и основанная на выявлении специфических генов и продуктов их деятельности – белков.



Такие новейшие методы молекулярной клинической диагностики инфекционных заболеваний как иммунофрементный анализ (ИФА) и полимеразная цепная реакция (ПЦР) в настоящее время быстро вошли в медицинскую практику и значительно подняли общий уровень диагностики в целом.

Эти лабораторные исследования позволяют получить ответ в кратчайшие сроки, причем по точности они близки к 100 %.

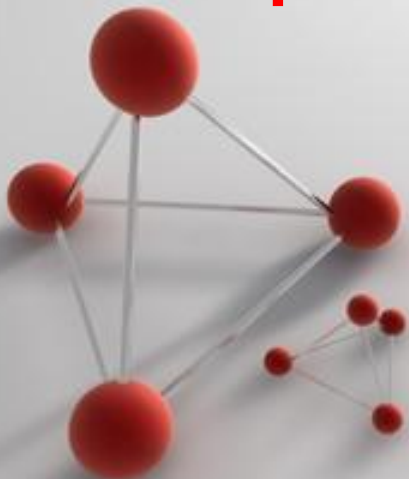
Однако указанные методы позволяют оценить ситуацию с разных сторон.



Врач может назначить не только ПЦР анализ, но и провести ИФА — диагностику для выявления определенной инфекции.

С точки зрения пациента подобный комплекс исследования вызывает много вопросов, поскольку все лабораторные анализы на первый взгляд кажутся абсолютно одинаковыми.

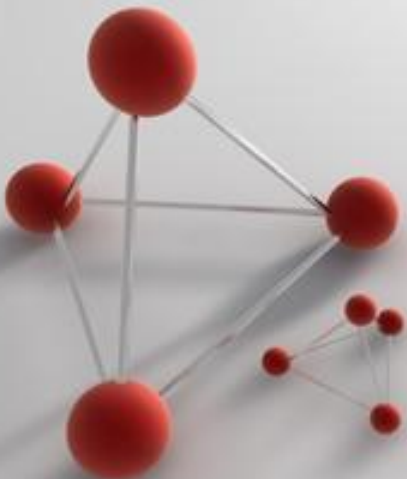
Но, несмотря на внешнюю схожесть, разница между ПЦР и ИФА есть.



Иммуноферментный анализ (ИФА)

Этот метод позволяет:

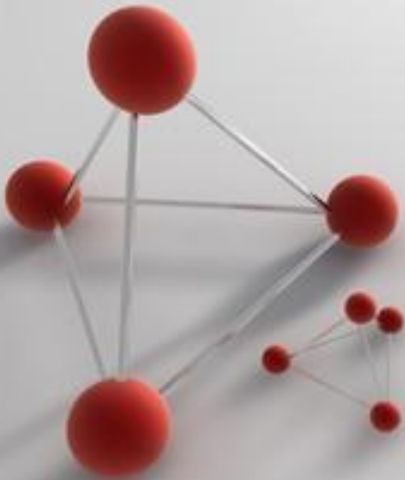
- **объективно выявлять реакцию организма человека в ответ на контакт с инфекционными агентами, выражающуюся в выработке специфических антител IgG, IgM, IgA**
- **обнаруживать специфический клеточный ответ**
- **обнаруживать антигены некоторых микроорганизмов**



Достоинства ИФА:

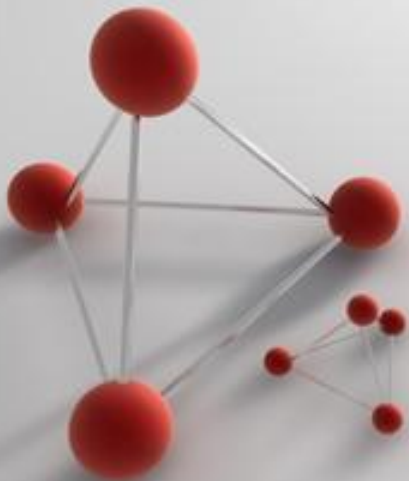
- **быстрота анализа**
- **низкая стоимость**
- **высокая чувствительность**
- **возможность стандартизации и автоматизации**
- **достаточно высокая воспроизводимость результатов**
- **высокая пропускная способность**

Для определения некоторых микроорганизмов, например *Rubella virus*, иммунологический подход предпочтительнее других



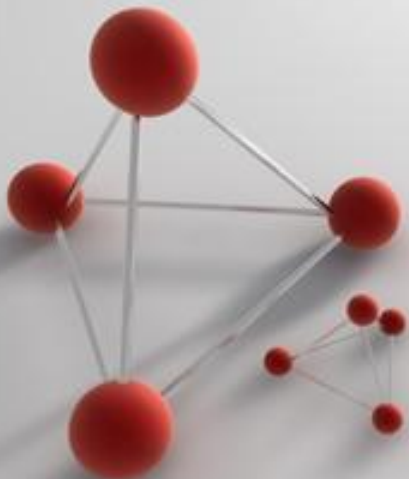
Недостатки ИФА:

- необходимость наблюдения за титром антител в динамике для уточнения остроты процесса
- поздняя сероконверсия
- «серологическое окно»
- перекрестные результаты у пациентов с циррозом печени, болезнями соединительной ткани, аутоиммунными заболеваниями, беременных и пожилых
- перекрестные результаты на антитела к другим микроорганизмам
- ложноположительная реакция в случае циркуляции антител класса IgG у детей, рожденных от инфицированных матерей, вакцинации и при аутоиммунных заболеваниях



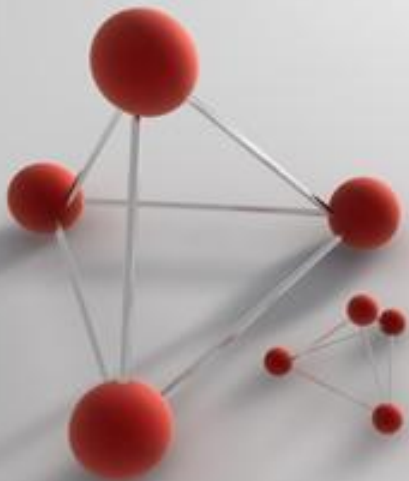
Диагностика по методу иммуноферментного анализа выявляет не возбудителя, а специфические белки - антитела, которые вырабатываются собственной иммунной системой человека в ответ на атаку вирусов или бактерий.

Иногда ИФА дает положительный результат у человека, переболевшего инфекционной болезнью в прошлом и уже не нуждающегося в лечении в настоящем. Это случается оттого, что иммунная система долгое время сохраняет «память» о перенесенных болезнях, а о некоторых из них даже на протяжении всей оставшейся жизни человека.



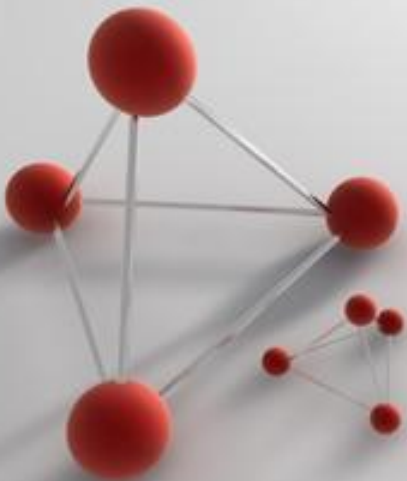
Результат ИФА изредка может получиться ложноотрицательным, если с момента заражения прошло еще недостаточно времени, и организм не успел среагировать на инфекцию выработкой специфических белков-маркеров.

Эти факторы следует учитывать при интерпретации результатов, поэтому в сомнительных случаях результаты ИФА перепроверяют, для чего используют ПЦР.



ПЦР-диагностика позволяет с высочайшей точностью выявить не только возбудителя болезни (бактерию, вирус), но и малейший фрагмент его ДНК, который является неповторимым для каждой формы жизни.

Поэтому ПЦР иногда называют ДНК-диагностикой, а специфичность этого анализа по некоторым технологиям достигает 100 %, причем он способен выявлять даже вялотекущие и хронические инфекции, не поддающиеся диагностике с помощью ИФА.



ПЦР-анализ позволяет не только определить, какой тип возбудителя присутствует в организме, но и **дает его количественную оценку**, то есть показывает, как много микробов присутствует в организме человека.

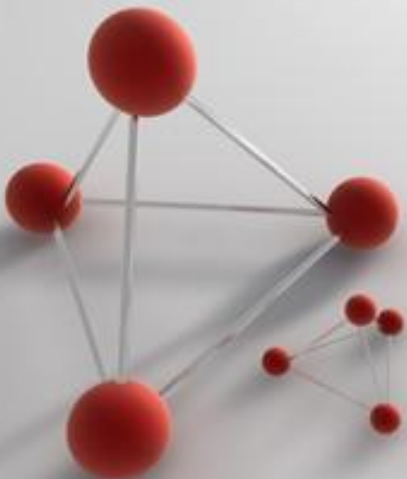
Количественный анализ ПЦР является очень важным в диагностике и в оценке эффективности лечения многих хронических инфекций (например, вирусного гепатита С).



Метод ПЦР позволяет:

1. Определить этиологию инфекции (т.е. какой именно микроорганизм или их сочетание вызвали воспалительный процесс).

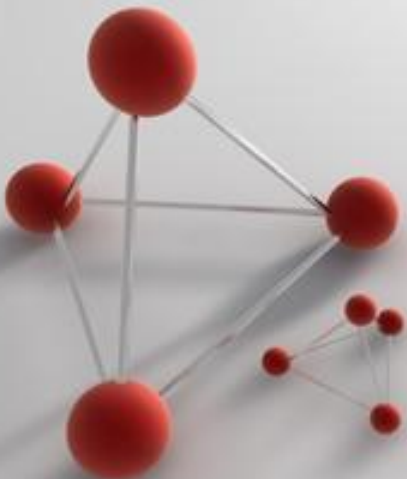
Для некоторых возбудителей, например, *Mycoplasma genitalium*, ПЦР – это единственный метод диагностики на сегодняшний день.



Метод ПЦР позволяет:

2. Определить количество возбудителя.

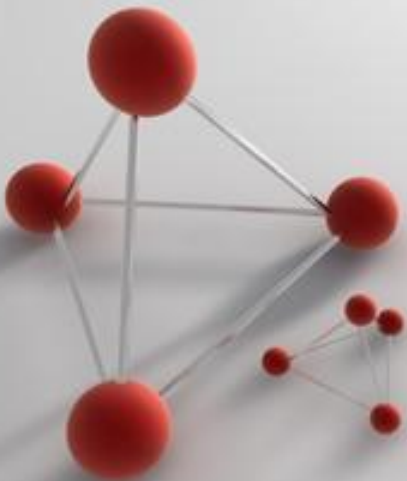
Особенно это актуально для условно-патогенных микроорганизмов (*Gardnerella vaginalis* и др.), которые вызывают патологию только при определенных условиях (например, при повышении концентрации).



Метод ПЦР позволяет:

3. Осуществить контроль за течением инфекционного процесса и оценить эффективность лечения.

Однако необходимо учитывать тот факт, что ПЦР может улавливать даже единичные фрагменты ДНК, которые могут оставаться некоторое время после лечения, в связи с чем контроль эффективности проводимой терапии рекомендуется проводить не ранее, чем через 2-3 недели после ее окончания.



Недостатки ПЦР:

Несмотря на все достоинства ПЦР, преимущественное его использование для выявления инфекционного возбудителя применимо не ко всем микроорганизмам.

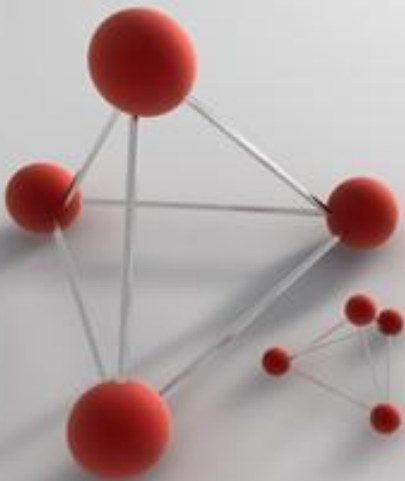
Так, например, для таких возбудителей как стафилококк или стрептококк лучше использовать микробиологический метод, а для диагностики бруцеллеза, боррелиоза, токсоплазмоза, краснухи, кори – целесообразнее использовать ИФА.



Недостатки ПЦР:

Следует учитывать, что данные ПЦР-исследования распространяются лишь на орган (ткань), клеточный материал которого (мазок/соскоб) забирается на исследование. Это вносит известные ограничения, не позволяющие в ряде случаев судить о распространенности процесса.

Например, выявление хламидий в канале шейки матки не позволяет утверждать о присутствии хламидий в маточных трубах, ткани яичников, суставах, легких и иных органах и тканях.



ПЦР отличается высокой информативностью и достоверностью относительно инфицирования (заражения) конкретного органа (участка ткани).

ИФА показывает распространенность процесса и возможную вовлеченность в инфекционный процесс органов и тканей, недоступных для прямой диагностики.

Сравнивая возможности ИФА и ПЦР в диагностике заболеваний, следует отметить, что метод ПЦР не позволяет установить стадию инфекционного процесса.

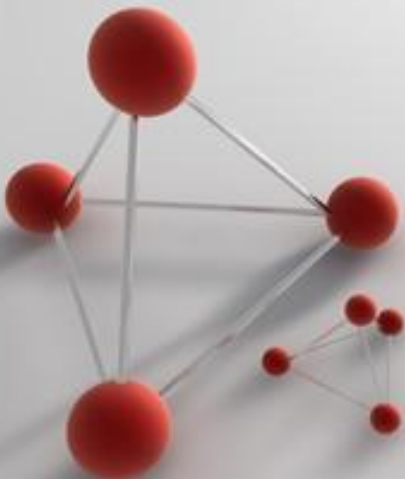
В связи с этим, роль ИФА в интерпретации результатов исследования может быть весьма существенной, поскольку данный метод позволяет определить avidность антител.



Авидность – это прочность связи между антителом и антигеном, которая отражает сроки заражения и длительность инфекционного процесса.

Величина индекса авидности (ИА):

- ниже 30-35 % указывает на свежую первичную инфекцию
- равная или превышающая 40 % указывает на наличие в сыворотке анамнестических высокоавидных антител, свидетельствующих об инфекции в прошлом
- в интервале 31-39 % свидетельствует о поздней стадии первичной инфекции или недавно перенесенной инфекции только при условии выявления антител в высокой концентрации.

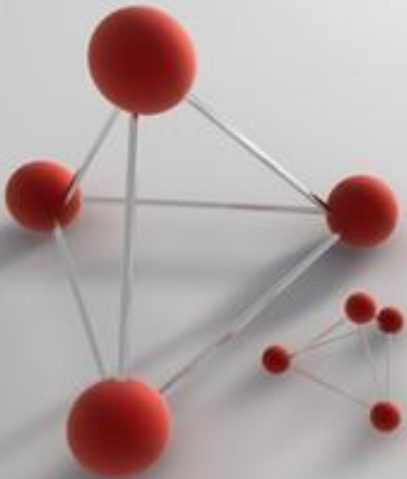


Характеристика метода	ПЦР	ИФА
Биоматериал	Мазок / кровь	Кровь
Цена	Выше	Ниже
Чувствительность	Выше	Ниже
Специфичность	Выше	Ниже
Срок выполнения	Дольше	Короче
«Человеческий фактор»	Отсутствует	Отсутствует
Подготовка к сдаче анализа	Требуется	Не требуется
Локализация возбудителя в организме	Только в месте взятия биоматериала	Роли не играет
Возможность определения стадии инфекционного процесса	Нет	Да
Отмена антибиотикотерапии при выполнении анализа	Да	Нет
Выявление возбудителя на ранней стадии	Да	Нет

Какой метод диагностики выбрать?

**Существуют особенности
применения ИФА и ПЦР для
диагностики некоторых
инфекционных заболеваний.**

**Рассмотрим их на примере
туберкулеза и хламидиоза.**

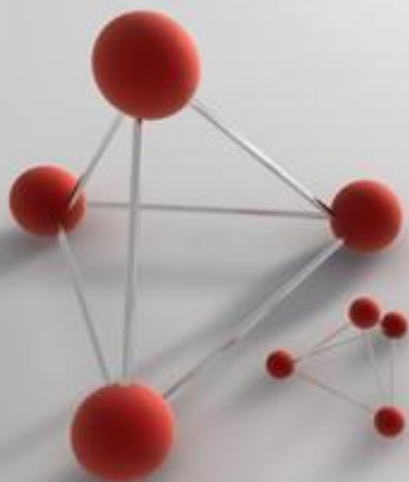


Особенности использования ИФА при туберкулезе

- антитела к микобактериям в том или ином количестве присутствуют в крови не только больных, но и здоровых инфицированных людей

- титры антител в сыворотке крови больных активным туберкулезом и у людей с неактивным туберкулёзом зависят от состояния иммунной системы пациента, особенностей течения болезни, давности инфицирования, тяжести заболевания

- микобактерии могут находиться в мембранной упаковке (фагосоме), в которой их антигенные детерминанты скрыты от иммунной системы и на фоне тотальной вакцинации населения БЦЖ имеют сомнительное диагностическое значение

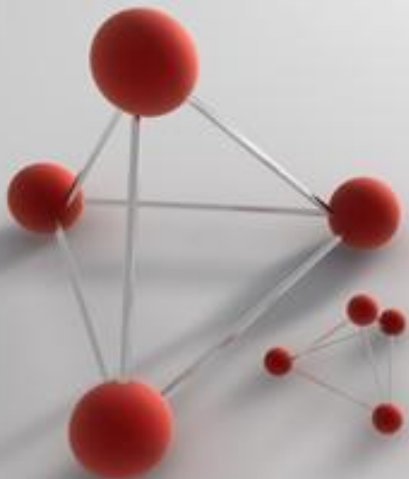


Метод ПЦР применяется для эффективного выявления *M. tuberculosis* в клинических образцах. ПЦР позволяет дифференцировать виды бактерий и проводить диагностику атипичных случаев туберкулеза (микобактериозы), часто имеющих сходную с туберкулезом клинико-рентгенологическую картину.

ПЦР имеет несомненное преимущество при диагностике туберкулеза:

- не дает неспецифических реакций
- высокая чувствительность (2-50 копий генома, не уступает культуральному методу)
- высокая оперативность (время проведения анализа - 6-8 часов).

В настоящее время разработаны и появились на рынке ПЦР-наборы для определения устойчивости микобактерий к противотуберкулезным препаратам и для дифференциальной диагностики микобактерий.

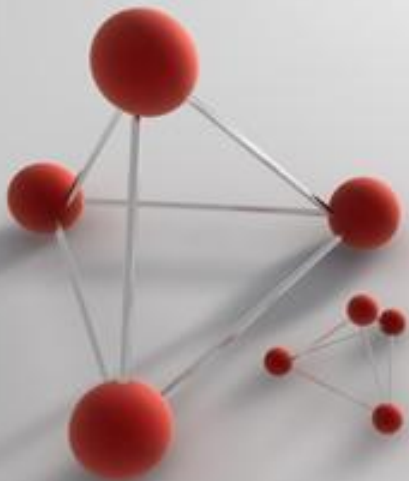


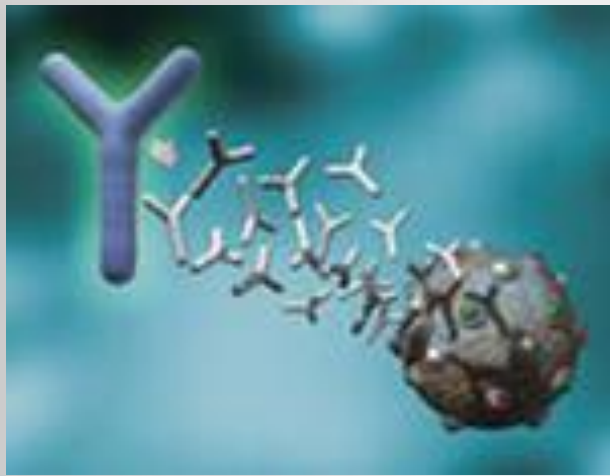
Особенности использования ИФА и ПЦР при хламидиозе

Мировые руководства и стандарты не рекомендуют постановку диагноза «хламидиоз» по наличию антител IgA, IgM, IgG.

Также не рекомендовано использовать определение антител для установления излеченности хламидиоза, т.к. под воздействием лечения морфологические и антигенные свойства возбудителей урогенитальных инфекций изменяются.

В этих случаях ПЦР-метод остается практически единственным, дающим возможность оценить результаты проведенной терапии урогенитальных инфекций.





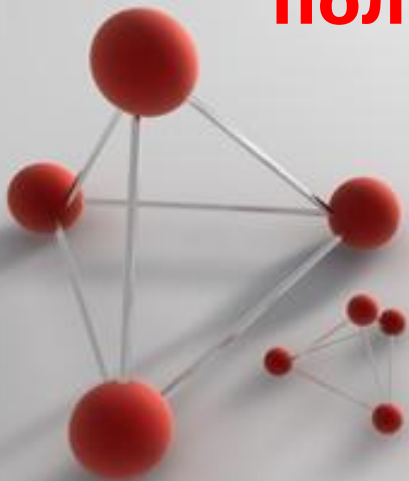
Таким образом, ИФА основан на выявлении не самого возбудителя инфекции, а специфических антител (белков-маркеров).

ПЦР, напротив, выявляет существующие в настоящее время инфекционные агенты (бактерии, вирусы, грибы).



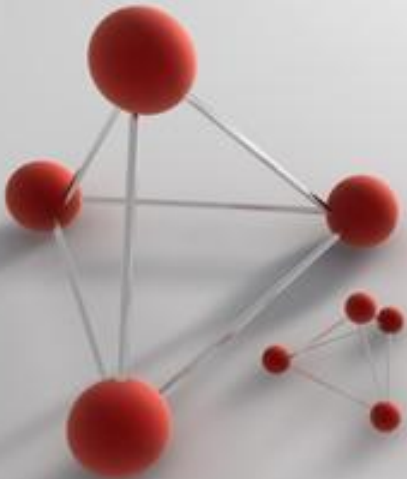
В случае сравнения результатов, полученных в ИФА и ПЦР, несовпадения могут быть следующими:

- положительный результат в ПЦР и отрицательный результат в ИФА;**
- отрицательный результат ПЦР и положительный результат ИФА.**



Положительный результат ПЦР и отрицательный - ИФА наблюдается, если у пациента имеется инфекция, но организмом не формируется иммунный ответ в виде антител.

Чаще такое случается при длительных хронических формах инфекции, когда организм перестает формировать достаточное для диагностики количество антител.



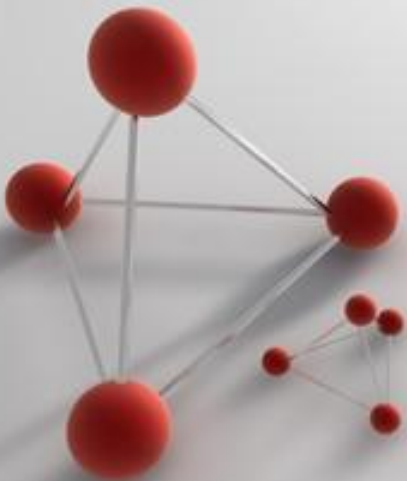
Такое же несовпадение результатов может быть обусловлено наличием «серологического окна».

«Серологическое окно» - период от инфицирования до сероконверсии.

Сероконверсия - появление в сыворотке специфических антител в количестве, позволяющем их выявить с помощью современных иммунологических методов.

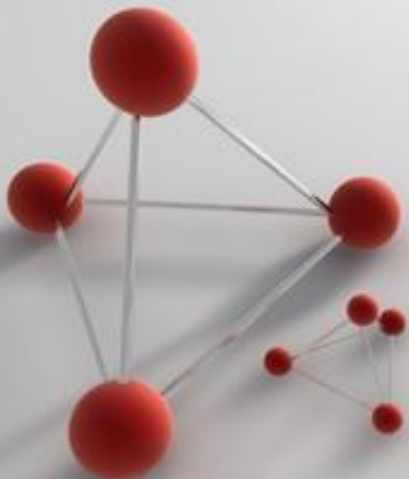
Это наиболее актуально для выявления вирусов гепатита С и иммунодефицита человека.

В условиях постоянно повышающихся концентраций антигена в результате репродукции вируса происходит активное снижение концентрации антител за счёт включения их в состав иммунных комплексов «антиген-антитело».



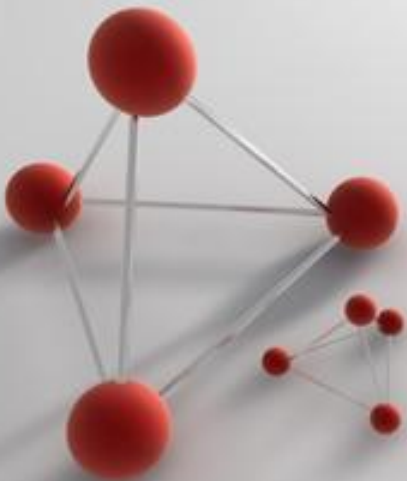
Кроме того, происходит подавление гуморального звена иммунного ответа в результате синтеза набора цитокинов, стимулирующих клеточное звено иммунитета.

Как следствие, в течение инфекционного процесса наблюдается длительное «серологическое окно» от момента заражения до сероконверсии.



Обычно заметное количество антител к ВИЧ появляется в крови через **2-10** недель после заражения, однако разброс во времени может быть весьма велик. Так, у **90-95 %** зараженных они обнаруживаются в течение **3-х** месяцев после заражения, у **5-9 %** – через **6** месяцев, а у **0,5-1 %** – и в более поздние сроки.

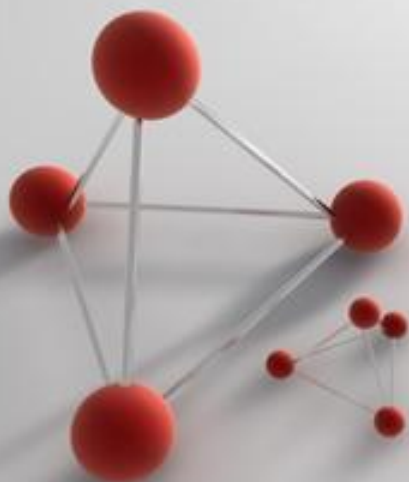
Выявление ДНК/РНК вируса методом **ПЦР** позволяет уменьшить продолжительность «серологического окна» в среднем на **11** дней и обнаружить патоген уже через **1-2** недели после заражения.



Проведение ПЦР позволяет выявить РНК вируса гепатита С не только в сыворотке крови, но и в биоптате печени, что важно при подтверждении роли вируса гепатита С в формировании гепатоцеллюлярной карциномы.

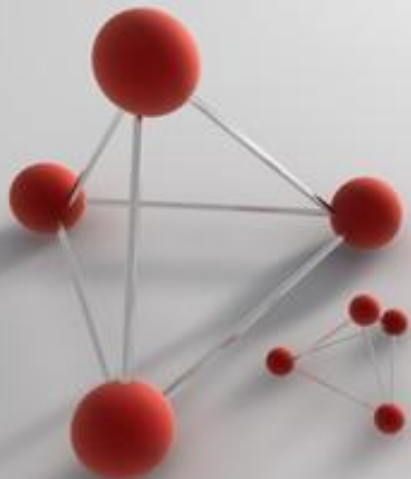
У подобных больных РНК вируса гепатита С регистрируется в гепатоцитах и при отсутствии anti-HCV и РНК вируса гепатита С – в сыворотке крови.

У ряда больных с самоограничивающимся течением инфекции anti-HCV не появляются никогда.

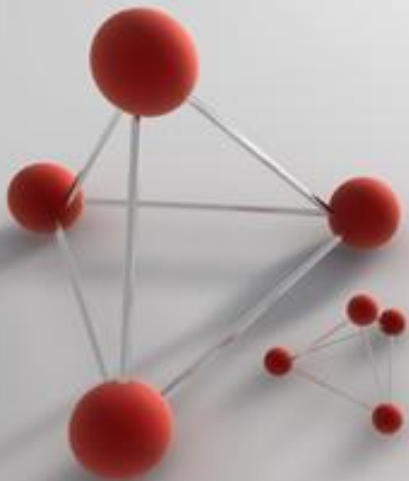


Кроме того, отрицательный результат ИФА на фоне положительного результата в ПЦР может наблюдаться у иммуносупрессированных пациентов и новорожденных с перинатальной инфекцией (кроме нетипичной картины, связанной с антителами матери).

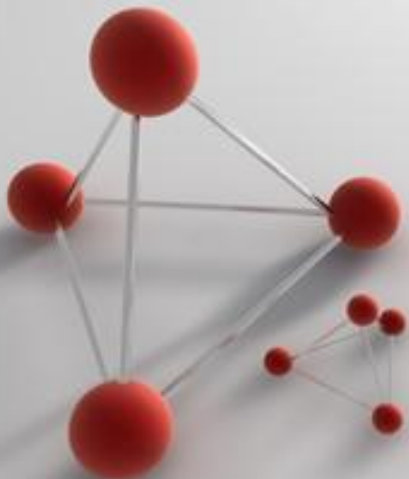
Так, при хроническом хламидиозе до 5 % больных имеют титр антихламидийных антител, не превышающий критического уровня.



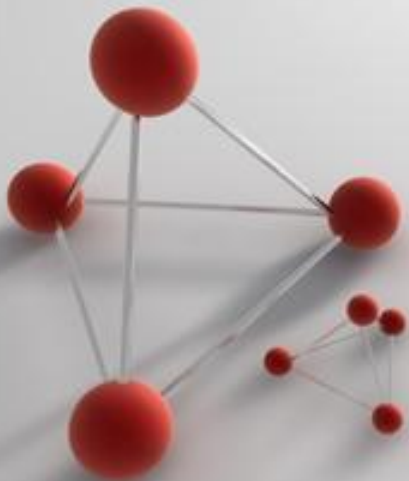
Аналогичная проблема может возникнуть при диагностике сифилиса в том случае, если заболевание проходит стадию первичного серонегативного сифилиса, когда стандартные серологические реакции крови еще отрицательные (первые 3-4 недели от возникновения твердого шанкра).



Кроме того, важно учитывать возможность высокой генетической изменчивости микроорганизмов, которая приводит к формированию серонегативных штаммов.



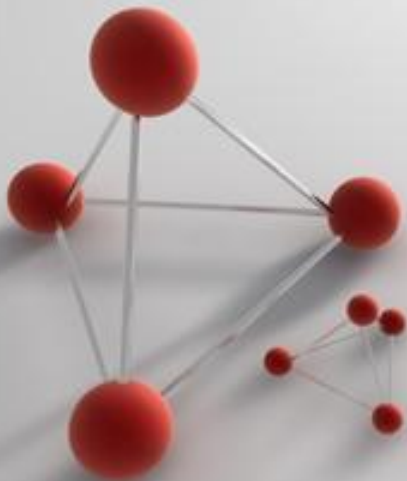
При обследовании новорожденных на наличие внутриутробных инфекций может быть получен ложноотрицательный результат серологического исследования не только вследствие влияния высокой концентрации материнских антител класса IgG, которые маскируют наличие IgM у ребенка, но и развития иммунологической толерантности.



Иммунологическая толерантность –
неспособность организма к иммунному
ответу на определенный антиген.

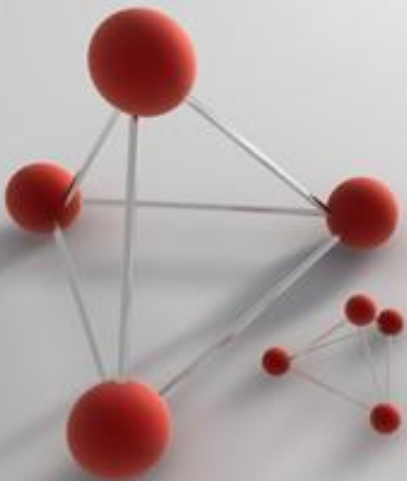
Сроки ее формирования варьируют
от нескольких часов до нескольких
суток, а ее длительность зависит от
персистенции антигена в организме и
скорости образования
иммунокомпетентных клеток из их
предшественников.

Индукции толерантности
способствует неспецифическая
иммунодепрессия (в том числе, под
влиянием лекарственных препаратов).



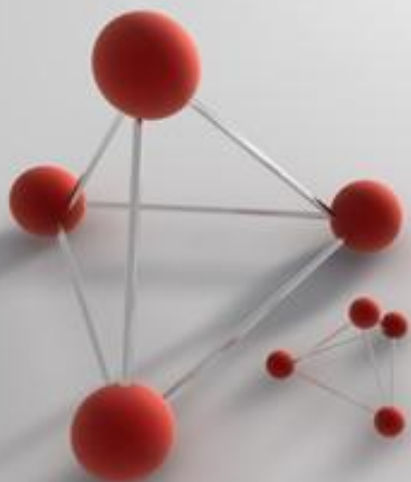
Генетически обусловленная серонегативность ряда заболеваний делает их недоступными для анализа стандартными серологическими методами, а при исследовании методом ПЦР обеспечивается положительный результат.

Это наблюдается при серонегативных спондилоартритах (ССА) – заболеваниях, которые характеризуются поражением крестцово-подвздошных сочленений и имеют тенденцию к семейной агрегации.



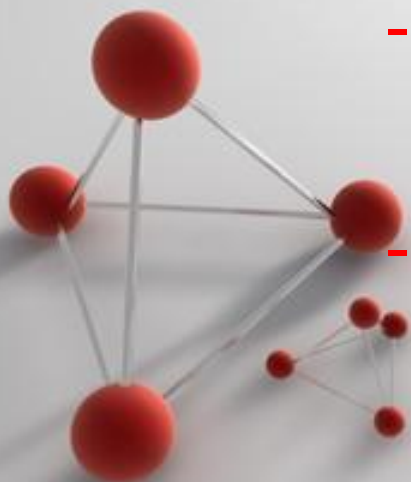
В группу серонегативных спондилоартритов включают 10 заболеваний, объединенных наличием при обследовании HLA-B27 – антигена:

- идиопатический анкилозирующий спондилоартрит**
- псориатический артрит**
- болезнь Рейтера**
- язвенный колит**
- болезнь Крона**
- болезнь Уиппла**
- ювенильный хронический артрит**
- реактивный артрит (иерсиниозный, шигеллезный, сальмонеллезный)**
- острый передний увеит**
- синдром Бехчета**



ПЦР + , ИФА -

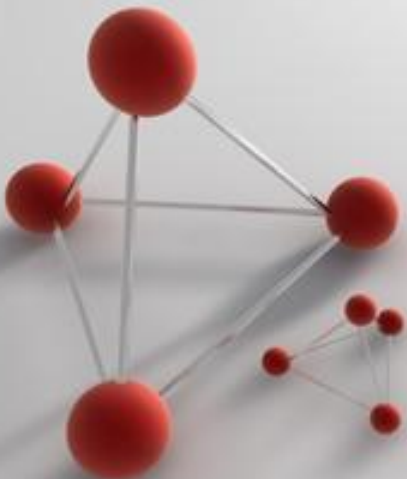
- **хронические инфекции**
- **«серологическое окно»**
- **иммуносупрессированные пациенты**
- **новорожденные с перинатальной инфекцией**
- **генетически измененные серонегативные штаммы**
- **иммунологическая толерантность**



Второй вариант несовпадения результатов ПЦР и ИФА (отрицательный результат в ПЦР и положительный результат в ИФА) может быть обусловлен выявлением «иммунологического следа».

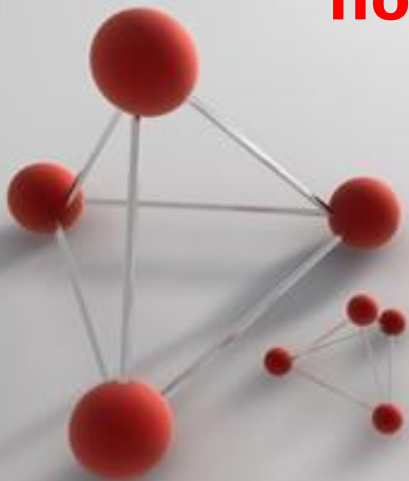
«Иммунологический след» – это остаточный уровень IgG после ранее перенесенной инфекции.

У некоторых людей повышенный уровень антител может сохраняться многие месяцы и годы после полного выздоровления, что связано с индивидуальными особенностями иммунной системы.



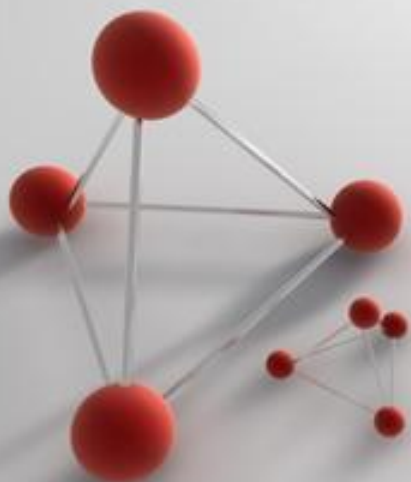
Другой причиной расхождения результатов может стать использование родоспецифических тест-систем для ИФА.

Например, в случае подозрений на атипичную пневмонию выбор тест-системы, выявляющей несколько видов хламидий, в первую очередь, респираторных (*C. pneumoniae*, *C. psittaci*), определяет получение положительного результата.



При этом, направление на анализ методом ПЦР с указанием только наиболее распространенного этиологического агента хламидийной пневмонии – *S. pneumoniae* может привести к получению отрицательного результата.

Это будет связано с использованием видоспецифической тест-системы для ПЦР, способной выявлять только указанный вид микроорганизма, тогда как возбудителем инфекционного процесса может быть *S. psittaci*.



Еще одним фактором несовпадения данных ПЦР и ИФА является зависимость результатов анализа методом ПЦР от используемого материала.

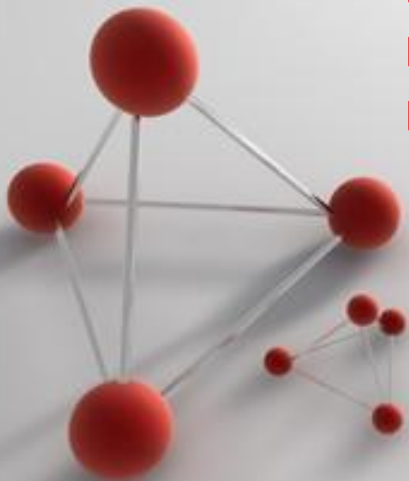
Материал для ПЦР должен быть получен из места предполагаемой локализации инфекционного и/или неинфекционного воспалительного процесса.

Для получения достоверного результата ИФА данный подход не является критичным.



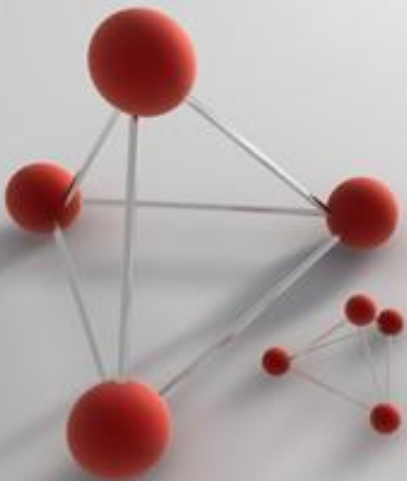
Например, при хламидийном сальпингите (воспаление маточной трубы) в крови пациентов будет определяться устойчивый уровень специфических антител, тогда как при анализе соскобного материала из влагалища или шейки матки методом ПЦР хламидии обнаружены не будут.

Учитывая тот факт, что в 50 % случаев заболевание протекает атипично, интерпретация результата ПЦР как отрицательного может привести к тяжелым последствиям, поэтому для подтверждения положительного результата ИФА и постановки диагноза показана лапароскопия (гидросальпинкс).



При туберкулёзе половых органов поражается эндометрий матки. Поэтому исследование влагалищного мазка с помощью ПЦР может привести к ложноотрицательному результату, в то время как ИФА будет положительным.

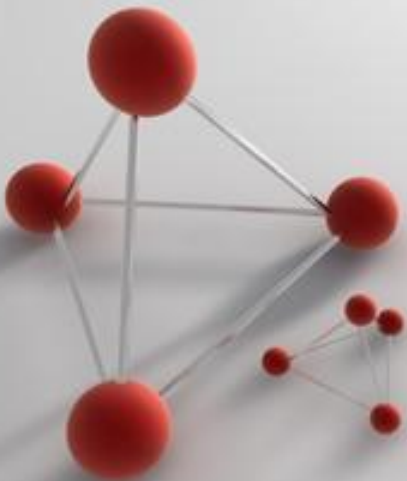
Необходимо при данной локализации заболевания исследовать материал, полученный из полости матки, либо - менструальную кровь.



Отрицательный результат ПЦР и положительный в ИФА могут наблюдаться, если процесс неактивный, и количество микробных тел в местах взятия мазков не очень велико, но в то же время идёт формирование антител.

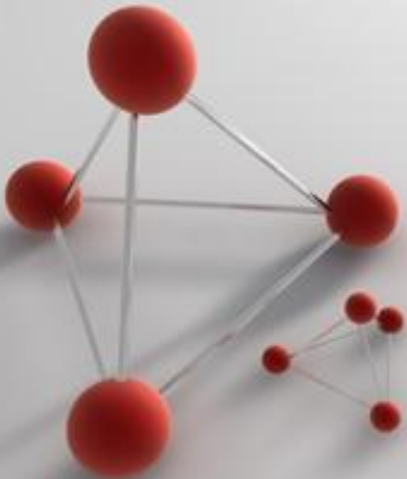
Возможность формирования антител и уровень титра зависят от вирулентности возбудителя и от особенности иммунной системы пациента.

Кроме того, антитела могут сохраняться в крови после лечения в течение определённого срока для каждой инфекции.



ПЦР - , ИФА +

- «иммунологический след»
- родоспецифические тест-системы для ИФА и видоспецифические для ПЦР
- место взятия материала для ПЦР определено неправильно
- мало микробных тел в местах взятия мазков

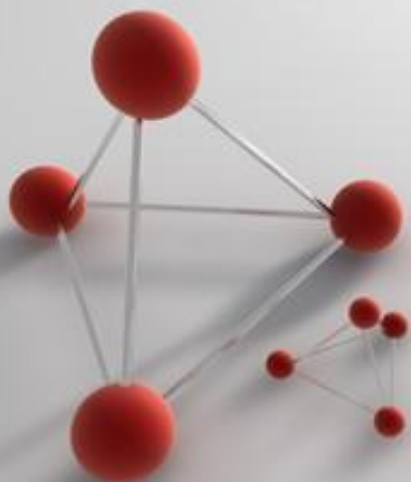


Взаимодействие лабораторной службы и врачебного персонала, является необходимым условием эффективной диагностики.

Назначение тех или иных диагностических исследований целиком и полностью зависит от лечащих врачей.

Однако, стремительное развитие диагностической медицины приводит к тому, что клиницисты не могут в полной мере оценить возможности современных технологий.

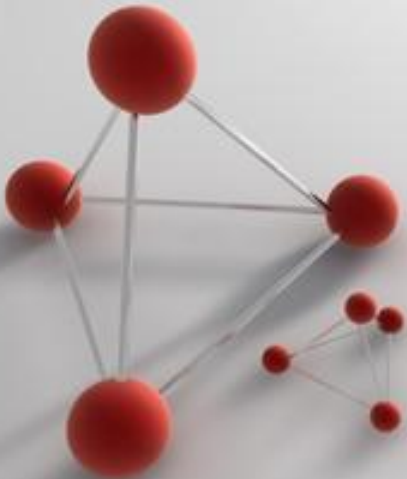
Часто недостаточная осведомленность или невозможность назначить нужное исследование, неправильный забор пробы приводят к тому, что уже на первом этапе допускаются ошибки, снижающие результативность использования дорогих и высокоинформативных технологий.



В первую очередь необходимо отметить комплексность современной лабораторной диагностики.

Сегодня вряд ли можно говорить о том, что какой-то из методов, применяемый изолированно, способен дать объективные и достоверные результаты.

На начальном этапе принятия решения о подборе необходимого комплекса диагностических мер требуется ставить вопрос о разумном сочетании как новейших, так и хорошо зарекомендовавших себя традиционных методов исследования с целью верификации присутствия инфекционного агента у пациента.



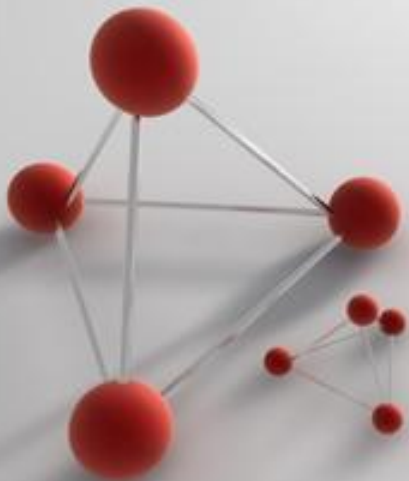
Исключительную важность имеет также доказательность участия инфекционного агента именно в том патологическом процессе, который наблюдают клиницисты.

Проблема заключается в том, что многие инфекционные агенты, с которыми приходится сталкиваться в ежедневной практике, относятся к так называемой латентной, или оппортунистической группе.

Выявление таких агентов не всегда является свидетельством их участия в патологическом процессе.

Иногда инфекционный агент может быть обнаружен, однако его участие в воспалительном процессе оказывается минимальным либо вообще отсутствует, поскольку в данном случае он является сапрофитной флорой.

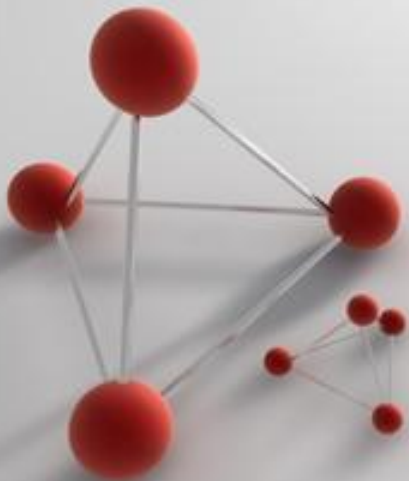
Это касается многих как вирусных, так и бактериальных инфекций.



Так как все методы в небольшом количестве случаев имеют вероятность ложноположительных результатов, то диагноз является достоверным, если инфекция подтверждена как минимум двумя методами.

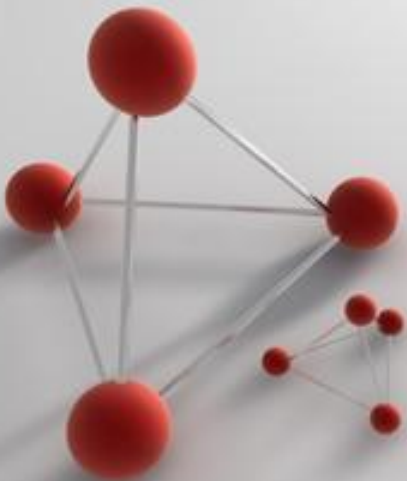
Но не всегда есть возможность подтвердить инфекцию другим методом в силу особенностей вышеперечисленных методов диагностики.

Поэтому перед принятием решения о лечении учитываются такие факторы как: лечение этой же инфекции ранее, наличие воспалительного процесса при обнаружении инфекции и т. д.

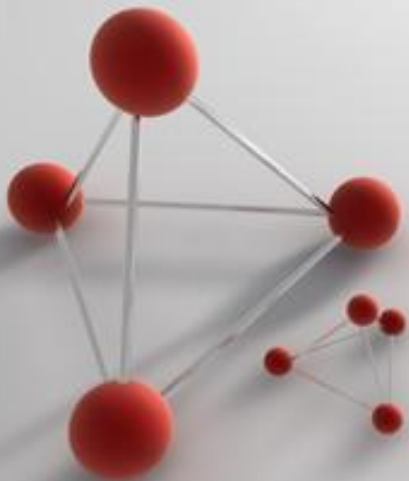


Подводя итоги, можно сказать, что и ИФА, и ПЦР сами по себе не являются панацеей в диагностике инфекций. Нельзя одной ПЦР- или ИФА-диагностикой заменить все существующие методы исследования, ими можно лишь дополнить другие методы для достижения реальных, точных, достоверных результатов.

Комплексное обследование пациента различными лабораторными методами дает возможность врачу-клиницисту получать более полную информацию как о наличии инфекционного агента, так и об иммунном статусе. Это позволяет более точно ставить диагноз, назначать соответствующее этиотропное лечение и вести последующий контроль терапии.



Таким образом, для того чтобы назначать этиологическое, а не синдромальное лечение, необходимо проводить мультифакторное исследование, стремясь точно определить роль того или иного патогена в конкретной клинической картине.



Благодарю за внимание!

